

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCIANA URBANO DOS SANTOS

“Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em uma Estação de Tratamento de Esgoto: avaliação das eficiências do processo de lodo ativado na remoção e de desinfecção por luz ultravioleta na inativação desses patógenos”

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Campinas, 2007.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Sa59o

Santos, Luciana Urbano dos

Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em uma estação de tratamento de esgoto: avaliação das eficiências do processo de lodo ativado na remoção e de desinfecção por luz ultravioleta na inativação desses patógenos / Luciana Urbano dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Regina Maura Bueno Franco.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Cryptosporidium*. 2. *Giardia*. 3. Lodo ativado. 4. Desinfecção. I. Franco, Regina Maura Bueno. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Occurrence of oocysts *Cryptosporidium* spp. and cysts *Giardia* spp. in the wastewater treatment plant: evaluation of removal efficiency of activated sludge process and the disinfection by UV light in inactivation these pathogens.

Palavras-chave em inglês: *Cryptosporidium*; *Giardia*; Activated sludge; Desinfection.

Titulação: Doutora em Parasitologia.

Banca examinadora: Regina Maura Bueno Franco, Edson Aparecido Abdul Nour; José Roberto Guimarães; Ana Maria Aparecida Guaraldo; Silmara Marques Allegretti.

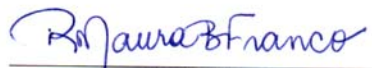
Data da defesa: 03/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 3 de agosto de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Regina Maura Bueno Franco
(Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Edson A. Abdul Nour


Assinatura

Prof. Dr. José Roberto Guimarães.


Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo


Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti.


Assinatura

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Assinatura

Prof. Dr. Fábio Trindade M. Costa

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo de Lima Isaac

Assinatura

Dedico este trabalho aos meus filhos Pedro e Lucas, por me motivarem a buscar sempre um mundo melhor e, à minha mãe, *in memoriam*.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

À Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A por permitir a realização das coletas na Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia e pelo material de consumo fornecido e aos funcionários da ETE pelas importantes informações sobre o funcionamento e controle da Estação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Parasitologia: em especial ao João B. de Oliveira pela constante disponibilidade em ajudar; as Prof^{as} Dr^a Ana Maria Guaraldo e Dr^a Delma A. Pegolo (CEMIB /UNICAMP) pelo valioso auxílio na idealização e realização do experimento de infectividade.

À Prof^a Dr^a. Regina Maura Bueno Franco pela orientação permeada com a busca de mais conhecimento e novos desafios e principalmente, pelo exemplo de profissionalismo.

Aos meus colegas do Laboratório de Protozoologia (L1): Paula, Sandra, Mirna, Taís, Diego e Romeu, por trabalharem em equipe e pelo importante auxílio de cada um, em diferentes etapas da realização desta tese. Ao Nilson por todo auxílio e conhecimento transmitido que foram fundamentais para a realização do meu trabalho. À Rita pelas horas de trabalho em conjunto raspando membranas, as discussões de artigos, as conversas e principalmente pelo carinho que se transformou em amizade e se expandiu para além do L1.

Às minhas “irmãs”: Paula, Teresa, Luciana Marisa e Ana Beatriz: que sem o incentivo, ajuda e amor, o caminho teria sido árduo. À minha querida tia Sônia, sempre presente na minha vida de forma tão amorosa, por mais esta

etapa de estudo compartilhada e ao Tio Roberto, pelo incentivo e correções dos textos escritos em inglês.

Ao meu pai e meu irmão pelo constante interesse e cuidado. Ao Claudio, pela amizade apaixonada que proporcionou momentos de pura descontração e felicidade.

Aos meus filhos pela paciência e compreensão com a minha ausência e a angústia gerada no final da tese, mas principalmente, por todas as alegrias compartilhadas com cada conquista obtida durante este trabalho.

Resumo

Entre muitas doenças de veiculação hídrica, a criptosporidiose e a giardiose são de particular interesse para a Saúde Pública, porque oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp. podem persistir por longos períodos no ambiente, sendo que estes dois protozoários patogênicos têm sido implicados como a causa de muitos surtos epidêmicos de gastroenterites nos últimos 25 anos. Em muitos desses surtos, o esgoto doméstico foi incriminado como a fonte de contaminação do manancial; os variados métodos de tratamento de esgoto não removem totalmente agentes patogênicos, evidenciando a necessidade de desinfecção do esgoto tratado antes do seu lançamento no corpo hídrico. Uma forma de tratamento de esgoto amplamente utilizada é o processo por lodos ativados, onde a degradação da matéria orgânica é realizada por bactérias aeróbicas. Em função da resistência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. ao processo de desinfecção por cloração, a radiação por luz ultravioleta (UV) têm sido avaliada como um processo alternativo. Para avaliar a eficiência de remoção de oocistos e cistos pelo processo de lodo ativado e de um reator de luz UV em inativar oocistos e cistos em uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da cidade de Campinas, 3 tipos de amostras foram selecionados para o estudo: i) afluentes (n=53), ii) efluente desinfetado por luz UV (n=38) e, iii) efluente sem desinfecção por luz UV (n=53). As amostras de afluente foram concentradas por centrifugo-concentração e as amostras de efluente (desinfetadas ou não por luz UV) foram processadas por filtração em membrana de éster de celulose) e, a visualização dos protozoários, feita pela reação de imunofluorescência direta, com anticorpos monoclonais. A avaliação do processo de desinfecção por luz

UV foi realizada com experimento de infectividade animal, inoculando-se 14 cistos/ camundongos da linhagem BALB/c nude. Cistos de *Giardia* spp foram mais freqüentes e em maior densidade nos três tipos de amostras. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados somente em 2 amostras de afluentes e em apenas uma amostra de efluente desinfetado por luz UV. O tratamento de esgoto pelo processo de lodo ativado reduziu 98,9 % dos cistos e 99,7 % dos oocistos. A administração intragástrica de cistos de *Giardia* spp. desinfetados ou não por luz UV em camundongos, resultou na liberação de cistos de *Giardia* spp., nas fezes e trofozoítos foram observados nas lâminas confeccionadas por aposição do intestino. Estes resultados indicam que a desinfecção por luz UV não foi completamente eficiente na inativação dos cistos de *Giardia* spp, no caso da ETE estudada.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*, *Giardia*, lodos ativados, UV, desinfecção.

Abstract

Among many water-borne diseases the cryptosporidiosis and giardiasis are of particular public health interest, because *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts can persist for long periods in the environment, and both pathogenic protozoa have been implicated as the cause of many outbreaks of gastroenteritis in the last 25 years. In many of those outbreaks, the domestic sewer was incriminated as to source of contamination of the spring; they varied treatment sewage approaches do not remove entirely agent's pathogens, showing up the need of disinfection of the treated effluent before of their launching in the water body. A form of address of sewer broadly utilized is the trial by activated sludge which way the degradation of the organic matter is carried out by aerobic bacteria and, in function of the resistance of *Cryptosporidium* spp and *Giardia* spp. to the chlorine disinfection, the ultraviolet light (UV) has been evaluated like an alternative trial of disinfection. In order to evaluate the efficiency of cysts and oocysts removal by the activated sludge process, and by a UV reactor in inactivating cysts and oocysts in one Wastewater Treatment Plant (WWTP) in Campinas, three sampling points were selected for study: *i*) influent (n=53), *ii*) treated effluent with UV disinfection (n=38) and *iii*) treated effluent without UV disinfection (n=53). The influent samples were concentrated by centrifugation and effluent samples (disinfected with UV light or not) were processed by cellulose esters membrane filtration, and protozoan visualization was analyzed by fluorescent monoclonal antibody tests. The investigation of disinfection potential by UV light was made with infectivity assay. Each mice of lineage BALB/c nude were intragastrically inoculated

a mean dosage 14 cysts. *Giardia* spp cysts prevailed with higher density in the three different sample types. *Cryptosporidium* spp. oocysts were observed in only 2 samples of influent and in just one sample of treated sewage with UV disinfection. The treatment by the activated sludge process promoted a reduction of 98.9 % of cysts and 99.7 % of oocysts. Gastric intubation of *Giardia* spp. cysts disinfected or not by UV light to mice resulted in cysts released in feces and trophozoites were also observed too in intestinal scrapings. The findings of this study indicate that disinfection by UV light was not completely efficient regarding the inactivation of *Giardia* spp cysts in the case of the WWTP studied.

Keywords: *Cryptosporidium*, *Giardia*, activated sludge, UV, disinfection.

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Material e Métodos

Figura 1. Foto aérea da Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia..... 63

Figura 2. Fluxograma da Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia..... 64

Figura 3. Caixa de areia indicando o vertedor..... 65

Figura 4.a e b Calha de lançamento do efluente da Estação de Tratamento de Samambaia para o córrego Samambaia, e calha de saída do reator de luz UV..... 66

Capítulo 1: Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* spp cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at sludge treatment plant in Campinas, south east of Brazil.

Figura 1 Cistos de *Giardia* spp. recuperados de amostras de esgoto em uma Estação de Tratamento no Brasil, durante 2 anos..... 88

Capítulo 2: Infectividade de *Giardia* spp. em camundongos BALB/c nude, inoculados com cistos obtidos de efluente de esgoto desinfetado por luz UV.....

Figura 1 – Estimativa média do número de cistos observados nas fezes dos 3 animais de cada grupo, coletadas do 5º dia ao 15º dia após a inoculação..... 99

Figura 2 – *Giardia* spp. **a:** Cisto observado em lâmina de aposição do íleo, coloração por Giemsa (1.000x) **b:** Trofozoíto observado em corte histológico realizado com o duodeno (1.000 x)..... 101

Figura 3 – **a:** Número de cistos eliminados por animal inoculado com efluente de esgoto (sem desinfecção por luz UV), contendo cistos de *Giardia* spp..... 101

b: Número de cistos eliminados por animal inoculado com efluente de esgoto (desinfetado por luz UV), contendo cistos de *Giardia* spp..... 102

Figura 4 – Número de trofozoítos observados nas lâminas de corte histológico de cada animal inoculado com efluente de esgoto (desinfetado ou não por luz UV), contendo cistos de *Giardia* spp..... 102

Considerações

Figura 1 – Cisto de <i>Giardia</i> spp. observado em amostra de efluente da Estação de Tratamento de Esgoto. Samambaia. RID (500 x).....	113
---	-----

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Capítulo 1: Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of <i>Giardia</i> spp cysts and <i>Cryptosporidium</i> oocysts by UV at sludge treatment plant in Campinas, south east of Brazil.....	85
--	----

Tabela 1 Eficiência de recuperação de cistos e oocistos pelas diferentes metodologias usadas neste estudo.....	87
---	----

..... Tabela 2 Presença de cistos nas fezes e trofozoítos nas lâminas de aposição do intestino de camundongos, para determinar a infectividade por cistos de <i>Giardia</i> spp. inativados por luz ultravioleta.....	88
--	----

..... Tabela 3 Dados da qualidade do efluente (turbidez e sólidos suspensos) da Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia, Campinas/SP, Brasil, durante 2 anos.....	89
--	----

Capítulo 2: Infectividade de <i>Giardia</i> spp. em camundongos BALB/c nude, inoculados com cistos obtidos de efluente de esgoto desinfetado por luz UV.....	91
---	----

Tabela 1 – Presença de cistos e trofozoítos nas fezes e em diferentes preparações realizadas a partir do jejuno e íleo de camundongos inoculados com cistos de <i>Giardia</i> spp. obtidos de esgoto tratado e desinfetado (ou não) pela luz UV.....	100
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

AFL = Afluente.

Caco 2 = Célula de adenocarcinoma do cólon

COWP = Proteína da parede do oocisto

DAPI = 4'6- diamidino-2-fenilindol

DBO = Demanda bioquímica de oxigênio

DNA = Acido desoxirribonucleico

DQO = Demanda química de oxigênio

ETA = Estação de Tratamento de Água

ETE = Estação de Tratamento de Esgoto

EFL+UV = Efluente desinfetado por luz ultravioleta

EFL = Efluente sem desinfecção por luz ultravioleta

EFLF= Efluente filtrado

FISH = *Fluorescent in situ hybridization*

HAART = Terapia anti-retroviral altamente ativa

HCT-8 = Célula de adenocarcinoma estomacal humano

HIV = Virus da Imunodeficiência humana

HSP70 = Proteína de choque térmico

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

mRNA = Ácido ribonucleico mensageiro

OMS = Organização Mundial da Saúde

ONU = Organização das Nações Unidas

OPAS = Organização Pan-Americana de Saúde

PCR = *Polimerase chain reaction*

pH = Potencial hidrogeniônico

PI = Iodeto de propidio

rDNA = Ácido desoxirriboliceico recombinante

RID = Reação de imunofluorescência direta

rRNA = Ácido ribonucleico ribossomal

SIDA = Síndrome da Imunoeficiência Adquirida

ST = Sentinela

UASB = Digestor anaeróbio de fluxo ascendente

UV = Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO	PÁGINA
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
.Lista de Abreviaturas.....	xiv
Introdução.....	1
Revisão da Literatura.....	9
1. Surtos de veiculação hídrica de criptosporidiose e giardiose.....	9
2. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	15
3. <i>Giardia</i> spp.....	30
4. Fontes de contaminação de mananciais com oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp.....	38
5. Esgoto.....	40
.....6. Tratamento do esgoto.....	41
.....7. Técnicas de detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp em amostras de esgoto.....	47
.....8. Eficiência dos tratamentos de esgoto na remoção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp.....	49
.....9. Processos de desinfecção do esgoto tratado.....	52
.....10 Metodologias para avaliação da eficiência dos processos de desinfecção e inativação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp.....	55

Objetivos.....	59
Objetivo geral.....	59
Objetivos específicos.....	59
Material e Métodos.....	60
1. Caracterização do local de estudo.....	60
1.1. Foto aérea da Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia.....	63
1.2. Fluxograma da Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia.....	64
2. Coleta das amostras e metodologias de concentração.....	65
2.1. Técnica de centrífugo – concentração.....	67
2.2. Técnica de filtração em membrana.....	67
3. Visualização por reação de imunofluorescência direta (RID) e teste confirmatório da morfologia com corante vital DAPI.....	69
4. Experimentos – controle da metodologia de detecção.....	72
4.1. Experimentos controle-negativos.....	72
4.2. Experimentos controle-positivos.....	72
5. Experimento de infectividade animal.....	74
5.1. Grupos de tratamento.....	76
5.2. Critérios de escolha das amostras de efluente utilizadas no experimento de infectividade animal.....	76
5.3. Sanitização da amostra de efluente positivo para cistos de <i>Giardia</i> spp.....	77

5.4. Inoculação das amostras e manutenção dos animais.....	78
5.5. Necrópsia e análise macroscópica e microscópica dos intestinos.....	79
5.6. Concentração das fezes.....	80
5.7. Cortes histológicos: preparação das peças.....	81
5.8. Cortes histológicos: corte das peças e coloração das lâminas.....	81
6. Análise dos dados.....	82
Resultados	84
Capítulo 1: Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of <i>Giardia</i> spp cysts and <i>Cryptosporidium</i> oocysts by UV at sludge treatment plant in Campinas, south east of Brazil.....	85
Capítulo 2: Infectividade de <i>Giardia</i> spp. em camundongos BALB/c nude, inoculados com cistos obtidos de efluente de esgoto desinfetado por luz UV.....	91
Considerações	110
Conclusões	115
Referências Bibliográficas	117

Introdução

A água é considerada um direito básico do ser humano, porém, este bem essencial tornou-se, nos últimos anos, um dos maiores problemas globais, em função de sua escassez e qualidade (SMITH et al., 2006). A idéia de que ela se extinguirá um dia é questionada por alguns especialistas: previsões de que nos países em desenvolvimento, a falta de água potável atingirá cerca de 4 bilhões de pessoas nos próximos 25 anos (caso nenhuma intervenção ocorra para frear a demanda), são chamadas de “a estratégia da escassez”. Os críticos alegam que nestas estimativas, são consideradas tão somente as águas presentes na superfície do Planeta, desconsiderando a sua renovação pelo ciclo hidrológico, as reservas subterrâneas e, os avanços tecnológicos que permitem que não exista um aquífero inacessível (REBOUÇAS, 2002). Porém, um fato é certo: as reservas de água disponíveis, estas sim, são limitadas e, muitas delas, com a sua qualidade comprometida. Acrescente-se a este cenário, a desigualdade de distribuição que agrava o problema do acesso da população mundial à água de boa qualidade.

Dados da Avaliação Ecológica do Milênio, realizada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) iniciada em 2001 e finalizada em 2005, mostra que o potencial de disponibilidade “per capita” de água estimado em 1950 era de 16.800 m³ pessoa/ano enquanto que no ano de 2000, esta taxa teve o valor alterado para 6.800 m³ pessoa/ano. Hoje, um terço da população mundial vive em áreas sujeitas à pressão da falta de água e, este percentual aumenta à medida que aumenta a demanda e o custo do tratamento para torná-la uma água potável

(ONU, 2006).

O Brasil é um país privilegiado quando se refere aos recursos hídricos, porém, esta abundância criou, na população, a cultura do desperdício e, no poder público, uma falta de consciência onde não são priorizados investimentos para proteção e manutenção deste recurso.

Visando facilitar o planejamento e gerenciamento dos recursos hídricos brasileiros, estes, foram subdivididos em 14 grandes bacias hidrográficas possuindo características ecológicas, econômicas e climáticas, bem diferenciadas (www.ana.gov.br). Esta distinção das características fica clara ao observar que as bacias da região nordeste são deficitárias, as da região norte possuem água em abundância, as do centro-oeste são exaustivamente utilizadas para irrigação agrícola e, as bacias do sudeste encontram-se em tal estado de degradação que medidas de controle são necessárias a curto prazo (BRAGA et al., 2002). Fica claro também que a quantidade de água está inversamente distribuída em relação à população e que a sua qualidade está diretamente ligada a esta concentração populacional.

Atualmente, a sustentabilidade dos corpos d'água é uma prioridade para as indústrias de água em todo mundo, uma vez que, a saúde pública e ambiental está diretamente ligada à água de boa qualidade. Esta preocupação era restrita às sociedades de países em desenvolvimento, onde a distribuição de água tratada e o esgotamento sanitário, em geral, são mais precários.

Segundo estudos da Organização das Nações Unidas (2006), no início do século XX, 44,0 % do número de mortes nos Estados Unidos foram por doenças

infecto-contagiosas, e as doenças transmitidas pela água contribuíram com um quarto deste percentual. Além disso, após o grande surto de criptosporidiose (causado pelo protozoário *Cryptosporidium* spp.) que aconteceu em Milwaukee (EUA) em 1993, ficou evidente que patógenos podem ser veiculados mesmo em águas que cumpram o padrão de potabilidade exigido às Estações de Tratamento pelas legislações vigentes de cada país. Com isto, estes patógenos podem desencadear epidemias de grandes dimensões como a de Milwaukee, que acometeu mais de 400.000 mil pessoas, causou 100 mortes e gerou um custo de 96 milhões de dólares ao governo americano, não sendo levado em consideração o valor das indenizações pessoais (MAC KENZIE et al., 1994; CORSO et al., 2003).

Atualmente, outros países desenvolvidos como Reino Unido, França e Canadá, já registraram várias epidemias causadas por veiculação hídrica (SMITH et al., 2006) embora elas representem apenas 1,0 % da mortalidade total da população (ONU, 2006). Estes países compartilham da crescente preocupação com a qualidade dos recursos hídricos, que são fontes de captação para tratamento e distribuição de água para a população.

Hipócrates, no século V a.C. foi o primeiro a desvincular as doenças humanas do mundo mágico e sobrenatural e, relacioná-las às características ambientais e, já naquela época, o “pai da medicina” tinha uma grande preocupação com a qualidade da água ingerida por seus pacientes (SEVALHO, 1993). Assim, mesmo que por intuito, a idéia de que microorganismos causadores de doenças ao homem, estavam presentes na água é muito antiga. Existem

registros de que os povos da Mesopotâmia, do Oriente e do Egito antigo, tratavam a água através dos processos de sedimentação e de filtração (BRANCO, 2002).

Já no século XVII, a concepção de que as condições sanitárias ruins estavam ligadas a enfermidades, surgiu com as grandes epidemias, que assolaram a Europa. Porém, achava-se que as doenças eram transmitidas pelo ar, onde as altas temperaturas da época seca produziriam uma destilação química das águas pantanosas e que substâncias voláteis decorrentes deste processo seriam transportadas pelo vento, causando as doenças infecciosas e os surtos epidêmicos (SEVALHO, 1993).

No século XIX, em 1847, ocorreu na Inglaterra uma reforma sanitária idealizada por Chadwick, que introduziu o uso da descarga hidráulica nos vasos sanitários, ligando-os à rede pública de esgoto com o objetivo de diluir os dejetos nas águas dos rios que, até então, recebiam apenas águas pluviais (BRANCO, 2002). Tal procedimento resultou nas grandes epidemias de cólera e disenteria, que dizimaram a população europeia nas décadas seguintes, sendo o primeiro relato de doença de veiculação hídrica por microorganismos feito em 1879, em função de uma epidemia de Tifo (GAJADHAR e ALLEN, 2004). Desde então, a contaminação dos mananciais só tem crescido, fazendo com que nos últimos 25 anos houvesse um grande aumento no número de enfermidades veiculadas através da água. Um dos fatores mais importantes na dispersão dessas doenças é o adensamento populacional, uma vez que em países pobres ele, freqüentemente, é mal ordenado e com falhas nas infra-estruturas sanitárias. Porém, estima-se que no final do século 21, 50,0 % da população mundial estará vivendo em centros

urbanos. No Brasil a taxa média da população urbana já é de 76,0 %, sendo concentrada nas regiões metropolitanas. O Estado de São Paulo, por exemplo, possui 91,0 % de sua população vivendo nas cidades (ONU, 2006; TUCCI, 2002).

O adensamento populacional provoca, além de outros problemas, por falta de infra-estrutura, a conseqüente geração de um grande volume de resíduos líquidos e o aumento na demanda por água potável, criando assim um círculo vicioso. Na relação consumo formação de despejos, um agravante do problema é que o consumo humano de água vai muito além das necessidades biológicas. Nos últimos cem anos, o aumento na demanda por água foi duas vezes maior que o percentual de crescimento populacional, evidenciando que o ser humano cria necessidades secundárias, sendo estas maiores, quanto maior for o poder econômico da sociedade (ONU, 2006).

No Brasil levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2002 aponta que dos 5.500 municípios brasileiros, 97,9 % contam com abastecimento de água, mas, cobrindo apenas 63,9 % do número dos domicílios e com grande desigualdade regional. Segundo este estudo, embora o volume de água distribuído tenha crescido 57,9 % no período de 1989 a 2000, a proporção de água não tratada dobrou. Hoje equivale a 7,5 % do volume total distribuído diariamente.

Segundo o IBGE (2002), em relação ao esgotamento sanitário, 47,8 % dos municípios não possuem rede pública de coleta de esgoto. Cerca de 32,0 % deles coletam e apenas 20,2 % dos municípios coletam e tratam o esgoto que recolhe das residências. Isto indica que cerca de 80,0 % de todo o esgoto produzido no

país é descartado *in natura* nos mananciais, fazendo da água uma importante fonte dispersora de patógenos.

A lista dos agentes patogênicos à saúde humana é vasta, compreendendo desde vírus, bactérias, fungos até protozoários e helmintos (NITHIUTAH I et al., 2004; OTTOSON et al., 2006) e as formas infectantes destes agentes, são liberadas via fezes e/ou urina dos hospedeiros infectados, fazendo com que o esgoto doméstico seja uma das mais importantes fontes de contaminação ambiental (MACPHERSON, 2005; MONTEMAYOR et al., 2005), causando assim um grande impacto na saúde pública e ambiental. Em geral, a maioria destes agentes de veiculação hídrica, ao serem ingeridos, tem como principal sintomatologia os processos diarreicos, o que fecha o ciclo de transmissão das enfermidades. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 88,0 % das mortes por diarreia em todo o mundo, são causadas por ingestão de água contaminada ou saneamento inadequado. Das 1,8 milhões de pessoas que vão a óbito por ano em função desta patogenia, 90,0 % são crianças com menos de 5 anos de idade (ONU, 2006).

A diarreia mata cinco vezes mais crianças do que o vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e é, hoje, a segunda principal causa de mortalidade infantil, após as doenças respiratórias. Isto ocorre porque mais de 1 bilhão de pessoas têm carência de água potável e, 2,6 milhões não têm acesso a saneamento adequado (ONU, 2006).

Embora a contaminação dos recursos hídricos também ocorra por meio da drenagem das pastagens e, de adubação orgânica utilizada na agricultura, a

avaliação molecular de amostras colhidas de vários surtos de doenças de veiculação hídrica tem atribuído ao esgoto doméstico, como sendo a principal fonte de contaminação dos mananciais, entre eles, no surto de Milwaukee (EUA - 1993) (MACPHERSON, 2005; AIYUK et al., 2006; OTTOSON et al., 2006).

Denomina-se esgoto sanitário o líquido resultante da água utilizada nas atividades domésticas, públicas, comerciais e industriais. O resíduo gerado pelas indústrias tem uma composição variável, conforme o tipo de indústria e o produto produzido. O doméstico e/ou comercial tem sua origem nas edificações que dispõem de banheiros, lavanderias e pias. Diferente do esgoto industrial a composição do esgoto doméstico e/ou comercial não apresenta grandes variações qualitativas, tendo sua composição assim fracionada: 99,9 % de água e 0,1 % de sólidos. Por causa desta pequena fração sólida, onde se encontram os patógenos, é que o esgoto precisa ser tratado antes da sua disposição no ambiente.

Os processos de tratamento de esgoto doméstico são realizados com base na ação de bactérias aeróbias ou não na degradação da matéria orgânica, sendo que variações na estrutura do armazenamento e no tempo de detenção do esgoto caracterizam os vários tipos de tratamento coletivos, tais como: o sistema de lodos ativados, lagoas de estabilização, UASB (digestor anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente) e filtros anaeróbios convencionais. De uma maneira geral, estes diferentes processos não apresentam uma eficiência de 100 % na remoção dos patógenos e, não são todas as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), que possuem a etapa de desinfecção do efluente antes do seu lançamento no corpo receptor; além disso, a cloração que é o processo de desinfecção atualmente mais

disseminado, na dosagem e tempo rotineiramente utilizados não é efetiva na inativação das formas de resistência de algumas espécies de patógenos.

Assim, maior atenção por parte dos centros de pesquisas, de tecnologia e do governo, deve ser dada à questão do tratamento de esgoto, uma vez que 2 milhões de toneladas deste resíduo são lançadas diariamente em corpos d'água em todo o mundo (COFIE et al., 2006), fazendo deste processo uma importante ferramenta de redução do impacto deste resíduo no ambiente.

Revisão da Literatura

Água e saneamento são assuntos importantes no que tange o combate à pobreza e a fome, na promoção de vidas longas e saudáveis e, na redução da mortalidade infantil. Esta intrínseca relação entre ambos com a saúde humana ocorre em função da atual situação quali e quantitativa dos recursos hídricos, que em sua maioria encontram-se contaminados com substâncias tóxicas ou agentes patogênicos causadores de enfermidades ao homem e a outros animais.

Uma vez contaminada, a água pode disseminar uma infinidade de agentes causadores de doenças como vírus, bactérias, fungos, helmintos e protozoários que, de uma forma geral, possuem formas dotadas de grande resistência e capacidade de sobrevivência e dispersão no ambiente, alcançando desta forma, novos hospedeiros.

Pesquisas estão sendo realizadas em todo o mundo, com o intuito de se conhecer melhor a biologia, a ecologia, e a dinâmica dos agentes patogênicos no ambiente aquático, em vários tipos de amostras hídricas, além daquelas que buscam o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias, que melhorem os processos de tratamento e de desinfecção da água e do esgoto. Esta preocupação se dá porque os mananciais, que são usados como fonte de captação para tratamento e distribuição de água para a população servem ainda, como corpo receptor do efluente originado, tratado ou não pelo homem.

1. Surto de veiculação hídrica de criptosporidiose e giardiose

Atualmente, enfermidades humanas onde os agentes etiológicos são veiculados pela água não estão mais restritas geográfica ou economicamente,

pois se tornaram uma preocupação global, atingindo também os países desenvolvidos (GAJADHAR e ALLEN, 2004).

Somente nos Estados Unidos, nos últimos 25 anos, aconteceram 740 surtos de veiculação hídrica, totalizando 571.373 casos e cerca de 100 mortes. Trezentos e quarenta e nove destes surtos não tiveram sua etiologia identificada, porém, quando identificada, os protozoários foram a principal causa na maioria deles (n=148), seguido das bactérias, dos agentes químicos e dos agentes virais (CRAUN et al., 1998).

Infecções intestinais por protozoários estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, com mais de 58 milhões de casos/ano em todo o mundo e, com custos diretos na ordem de US\$ 15 milhões (SAVIOLI et al., 2006). É então compreensível que hoje, entre os vários agentes patogênicos com potencial de veiculação hídrica, os protozoários sejam uma preocupação constante para as indústrias produtoras de água potável (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2003; MACPHERSON, 2005).

Em nível mundial, os protozoários foram a causa de 325 surtos epidêmicos de veiculação hídrica nos últimos anos, ocorridos nos Estados Unidos e Europa, e entre as várias espécies, como *Entamoeba histolytica* e *Cyclospora cayetanensis*, destacaram-se *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. que foram os agentes etiológicos de 50,8 % e 40,6 % destes surtos, respectivamente (KARANIS et al., 2007). Estes protozoários causam gastroenterite no homem e em outros animais; *Cryptosporidium* spp. é, atualmente considerado um patógeno emergente enquanto *Giardia* spp., um patógeno re-emergente (MONIS e THOMPSON 2003; HUNTER e THOMPSON, 2005), pois as enfermidades criptosporidiose e a

giardiose, respectivamente, apresentaram um aumento da incidência em humanos nas últimas duas décadas e há perspectiva do aumento de casos em um futuro próximo (LUNA, 2002).

Muitos fatores contribuíram para a emergência e re-emergência destes protozoários: *i*) o aumento populacional; *ii*) a globalização, que facilita o transporte de pessoas infectadas e/ou alimentos contaminados de um lado para o outro do planeta, num curto período de tempo; *iii*) o advento da SIDA e de tratamentos que debilitam o sistema imunológico humano, como a quimioterapia e as drogas imunossupressoras para transplante de órgãos; *iv*) a característica zoonótica de algumas espécies dos parasitos; *v*) a baixa dose necessária para causar a infecção; *vi*) a eliminação, pelo hospedeiro, de um grande número de formas infectantes; *vii*) fatores sociais (como o envelhecimento da população) e políticos e, *viii*) a resistência destas formas ao estresse ambiental e aos desinfetantes usados nos processos de tratamento de água e esgoto (TUCCI, 2002; GAJADHAR e ALLEN, 2004).

O grande potencial de veiculação hídrica destes protozoários fica evidente nos surtos ocorridos nos Estados Unidos, Japão, Canadá, Itália, Inglaterra, Austrália e Nova Zelândia, registrados no período de 1984 a 1999. De 83 surtos epidêmicos de criptosporidiose, 72 deles foram transmitidos diretamente pela água, seja através de água potável ou águas recreacionais. Neste levantamento, não foi levado em conta os surtos transmitidos por alimentos que podem ter sido contaminados com os oocistos, via a água de irrigação (FAYER et al., 2000).

Giardia spp. é considerado um contaminante comum de águas superficiais nos Estados Unidos (CHAURET et al., 1995) o que levou os norte-americanos a

estipularem e adotarem padrões mais rígidos para o tratamento de água, uma vez que, em vários surtos epidêmicos de veiculação hídrica, não houve correlação entre a presença destes protozoários e de indicadores de contaminação fecal como os coliformes totais e os termotolerantes (LEMARCHAND e LEBARON, 2003).

Na Inglaterra e no País de Gales, 89 surtos epidêmicos de doenças infecciosas intestinais ocorreram por veiculação hídrica entre 1992 e 2003 e, em 70,0 % delas o agente etiológico foi *Cryptosporidium* spp. e em 2,0 %, a causa foi *Giardia* spp. Dos 35 surtos onde a contaminação ocorreu em piscinas, 33 deles foi de criptosporidiose e 2 de giardiose. Neste tipo de ambiente há a possibilidade de ocorrer acidentes fecais, principalmente com crianças, propiciando a contaminação. Os outros 54 surtos foram veiculados pela água potável, que havia sido captada, tratada e distribuída à população por Estações de Tratamento de Água (ETA) públicas ou privadas (SMITH et al., 2006b).

No Brasil, surtos de protozoários por veiculação hídrica têm sido registrados. No final de 2001 e início de 2002, o protozoário *Toxoplasma gondii* foi transmitido via água distribuída à população na cidade de Santa Isabel do Ivaí /Pr e, acometeu severamente cerca de 290 pessoas, sendo o maior surto de toxoplasmose por veiculação hídrica registrado em todo o mundo (MOURA et al., 2006).

Outros dois surtos ocorreram nas cidades de General Salgado/SP (em 2000-2001) e Antonina/Pr (2001), onde a água distribuída para a população, veiculou o protozoário *Cyclospora cayetanensis* que causa gastroenterite no homem (Funasa, 2002; Zini et al., 2004).

Embora nenhum surto de *Cryptosporidium* spp. ou *Giardia* spp., por veiculação hídrica tenha sido devidamente registrado em nosso país, fica evidente a fragilidade dos sistemas de distribuição de água no Brasil e, a real possibilidade de ocorrência de surtos destes protozoários por veiculação hídrica em função da freqüente contaminação de nossos mananciais por estes patógenos.

Desde que as pesquisas para detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras ambientais se iniciaram no Brasil, eles estão sendo detectados nos recursos hídricos brasileiros. Dias Júnior (1999) detectou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em águas superficiais e de esgoto da cidade de Araras/SP e, Farias et al., (2002) detectaram a presença de oocistos em água de um córrego e de esgoto na cidade de São Paulo/SP.

Em um levantamento realizado em 28 mananciais do Estado de São Paulo, 5,0 % deles foram positivos para *Cryptosporidium* spp. e 31,5 % para *Giardia* spp. e, o rio Atibaia, principal fonte de captação de água para tratamento e distribuição da cidade de Campinas/SP, foi considerado um dos pontos críticos, com concentração de 521 cistos/litros (HACHICH et al., 2004). Franco et al., (2001) também detectaram oocistos e cistos destes protozoários na água bruta do Rio Atibaia, com concentração de 57,5 cistos e 54,1 oocistos/0,5 litro.

Estudos comparativos sobre o risco de surtos epidêmicos de criptosporidiose por veiculação hídrica sugerem que ações como o conhecimento da fonte de contaminação e alterações no tratamento, devam ser tomadas caso números ≥ 3 a 30 oocistos ou cistos/100 litros de água tratada sejam encontrados, pois já indica risco de surto epidêmico (CARMENA et al., 2007).

Embora com muitos registros de surtos epidêmicos através da água, desde a década de 80, *Cryptosporidium* spp. só passou a ser considerado um problema de saúde pública após o episódio de Milwaukee (Wisconsin – Estados Unidos) em 1993. Este surto marcou o início de vários estudos sobre este parasito, pois apresentou números significativos como: 403 mil pessoas infectadas e 100 mortes, sendo considerado, que estes números podem ter sido subestimados, uma vez que somente pessoas com o sintoma de diarreia aquosa foram consideradas no levantamento oficial (MAC KENZIE et al., 1994). Além disso, causou um gasto de U\$ 96,2 milhões aos cofres públicos sendo U\$ 31,7 milhões de custos médicos e 2 vezes mais (cerca de U\$ 64,6 milhões) em perda de produtividade (SUNNOTEL et al., 2006; FAYER, 2004). O fator mais alarmante deste surto foi o fato dos oocistos de *C. hominis* (genótipo Ib) chegarem à população através da rede pública de distribuição de água após o tratamento convencional, onde a água atingia todos os padrões estabelecidos pela legislação vigente e, o esgoto doméstico ter sido a causa de contaminação do manancial utilizado na captação da água bruta (MAC KENZIE et al., 1994; PENG et al., 1997; SUNNOTEL et al., 2006).

Durante o outono e inverno de 2004 e 2005, na Noruega, um surto de giardiose de veiculação hídrica acometeu mais de 1.500 pessoas, sendo considerado um dos maiores surtos em número de pessoas afetadas. Os cistos foram transmitidos via água potável onde a ETA não possuía sistema de tratamento por filtração e utilizava a cloração como processo de desinfecção (ROBERTSON et al., 2006). Uma investigação molecular de amostras fecais obtidas durante este surto indicou que a maioria dos isolados de *Giardia* spp.

estava relacionado ao subgenótipo BIII (ROBERTSON et al., 2007), genótipo da assembléia B com reconhecido potencial zoonótico. Assim como no surto de criptosporidiose de Milwaukee (EUA), um pequeno número de cistos foram detectados na água e o esgoto doméstico foi a provável fonte de contaminação do recurso hídrico (ROBERTSON et al., 2006).

Em função dos múltiplos modos de transmissão, surtos de criptosporidiose e giardiose podem se iniciar a partir de uma fonte comum e, em seguida, ter uma propagação contínua através do contato direto pessoa-à-pessoa dentro de uma comunidade (KATZ et al., 2006). Assim, em 2004, a criptosporidiose e a giardiose foram incluídas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), na lista da “Iniciativa das Doenças Negligenciadas”, pois, juntamente com vírus e bactérias fazem parte de um complexo grupo que restringem o desenvolvimento e a melhoria socioeconômica, não permitindo que alguns países desenvolvam todo o seu potencial (SAVIOLI et al., 2006).

2. *Cryptosporidium* spp.

Desde que o pesquisador Ernest E. Tyzzer descreveu o protozoário *Cryptosporidium* spp. parasitando o estômago do rato *Mus musculus*, no ano de 1907, muitas pesquisas foram realizadas sobre este parasito e várias espécies foram identificadas. Do início do século 20 até 1955, apenas 3 espécies de *Cryptosporidium* foram descritas: *C. muris*, *C. parvum* e *C. meleagridis*. O primeiro registro de criptosporidiose humana ocorreu em 1976 e em 1977 foi feito o primeiro relato deste parasito em répteis (FAYER, 2004). Com o advento da SIDA na década de 80, o número de casos em humanos aumentou e, após o relato feito

pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) de que 21 pessoas HIV+ de diferentes cidades apresentavam criptosporidiose, este protozoário passou a receber maior atenção por parte dos pesquisadores tornando-se, nos anos seguintes, o agente etiológico de uma das mais sérias e penosas infecções oportunistas associada a este grupo de pessoas (TZIPORI e WARD, 2002).

As espécies do gênero *Cryptosporidium* pertencem ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Eucoccidiida e família Cryptosporidiidae e diferem de outros coccídios do grupo, pelo fato de serem resistentes aos desinfetantes, por não haver ainda uma droga eficaz no seu controle, possuírem habilidade de auto-infecção, pois produzem oocistos de parede fina e, pela sua localização na célula hospedeira. A taxonomia do gênero *Cryptosporidium* ainda é controversa e foi fundamentada em critérios como: a morfologia dos oocistos, a presumível especificidade pelo hospedeiro e, em estudos de transmissão cruzada (MONIS e THOMPSON, 2003). A partir de 1990, o uso das ferramentas moleculares causou um grande impacto no esclarecimento da classificação deste grupo com a avaliação, por exemplo, do *locus* gênico 18S rDNA, da proteína da parede do oocisto (COWP) e, da proteína de choque térmico (HSP70), que auxiliaram no agrupamento das espécies as quais, em alguns casos, possuem genótipos com variações maiores do que as observadas entre espécies (CACCIÒ et al., 2005).

O gênero *Cryptosporidium* compreende 16 espécies, sendo 7 delas com reconhecida capacidade para infectar o ser humano, isoladas ou concomitantemente (Tabela 01). Até o momento, mais de 30 genótipos são reconhecidos, porém, à medida que mais dados sobre a sua biologia e suas

características ecológicas sejam realizados, alguns desses genótipos podem ser elevados ao nível de espécie. De qualquer forma, o alto número de genótipos reconhecidos atualmente, indica a grande diversidade genética do gênero (SANTÍN et al., 2007), sendo que o conhecimento de genótipos e sub-genótipos pode auxiliar no entendimento da dinâmica de transmissão deste parasito, em uma determinada população de hospedeiro (GATEI et al., 2007).

Tabela 1. Taxonomia das espécies de *Cryptosporidium*, sítio de localização no hospedeiro e os seus principais hospedeiros.

Espécie e o sítio de localização		Principais hospedeiros
Estomacal	Intestinal	
<i>C. bovis</i>	<i>C. andersoni</i>	Bovinos
		Ruminantes
	<i>C. baileyi</i>	Pássaros
	<i>C. canis</i>	Canídeos e humanos
<i>C. galli</i>	<i>C. felis</i>	Felinos e humanos
		Pássaros
	<i>C. hominis</i>	Humanos e macacos
	<i>C. meleagridis</i>	Pássaros e humanos
<i>C. molnari</i>		Peixes
<i>C. muris</i>		Roedores e humanos
	<i>C. parvum</i> (genótipo 2 ou C)	Ruminantes e humanos
<i>C. serpentis</i>	<i>C. saurophilum</i>	Lagartos e cobras
		Cobras e lagartos
	<i>C. suis</i>	Suíños e humanos
	<i>C. scophithalmi</i>	Peixes
	<i>C. wrairi</i>	Porcos da Índia

Fonte: Cacció et al., 2005 e Sunnotel et al., 2006.

C. parvum é considerada pelos especialistas como um complexo de espécies com distintos genótipos e, inicialmente, reconheciam-se 2 genótipos: o genótipo humano (1 ou H) e o genótipo bovino (2 ou C). Hoje, é aceito o genótipo humano como uma nova espécie: *C. hominis* que possui, quando comparado com *C. parvum* (2 ou C), diferenças genéticas, de hospedeiro, na distribuição das lesões, na intensidade da infecção, na eliminação de oocistos e, nos sintomas da parasitose (CACCIO et al., 2005; MORGAN-RYAN et al., 2002). A distribuição geográfica e a sazonalidade da infecção também difere entre estas duas espécies:

estudos de prevalência e epidemiologia molecular indicam que *C. hominis* é mais freqüente nas Américas, África, Ásia e Austrália e durante as estações do verão e outono, enquanto que *C. parvum* genótipo bovino, é o principal agente etiológico da parasitose na Europa (principalmente Inglaterra), sendo mais freqüente em áreas rurais que urbana e, durante a estação da primavera (CACCIÓ et al., 2005).

C. hominis e *C. parvum* genótipo bovino são as espécies mais detectadas no ser humano; *C. hominis* já foi detectado naturalmente em peixe-boi marinho, em bovinos e, experimentalmente em ovinos. *C. parvum* genótipo bovino infecta em condições naturais o homem e outros ruminantes além do gado e, em condições experimentais camundongos, ratos e cães (FAYER, 2004; CACCIÓ et al., 2005).

Recentemente, Slapeta (2006) propôs a denominação específica de *C. pestis* n. sp. para o genótipo bovino de *C. parvum* porém, esta classificação foi considerada inválida por Xiao et al. (2007), que alegaram que na identificação desta nova espécie, o autor não levou em consideração as orientações estabelecidas no *Simpósio de Taxonomia do gênero *Cryptosporidium* necessárias para se denominar uma nova espécie, que são: a análise morfométrica dos oocistos, a caracterização genética de pelo menos três marcadores e com sequenciamento de 3 *locus* gênico diferentes, a demonstração natural de especificidade do hospedeiro e, as normas do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica – CINZ. Porém, como a controvérsia é uma característica

* Sixth International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, Paris, France, July 2002.

na taxonomia de *Cryptosporidium*, a discussão continua e, Slapeta (2007) decidiu manter a denominação de *C. pestis* para o genótipo bovino de *C. parvum*.

Por outro lado, Xiao et al. (2004) propõe que a denominação *C. parvum* seja referência apenas para designar o genótipo bovino desta espécie. Para outros genótipos do complexo *C. parvum*, seria colocado apenas o gênero *Cryptosporidium* seguido da genotipagem, ficando o conceito assim estabelecido: *Cryptosporidium* genótipo cervídeo (e não *C. parvum* genótipo cervídeo) ou *Cryptosporidium* genótipo de macaco (e não *C. parvum* genótipo de macaco).

Embora provocando muito debate, a questão taxonômica e molecular, do ponto de vista da epidemiologia da criptosporidiose é muito importante, pois a presença, por exemplo, de *C. parvum* (genótipo bovino) na água, não indica necessariamente que a fonte de contaminação não teve origem humana (HUNTER e THOMPSON, 2005), entretanto é importante considerar que não existem métodos fáceis e rápidos para identificação das espécies e seus genótipos, dos oocistos recuperados em amostras ambientais (BOWMAN, 2005).

Além de *C. hominis* e *C. parvum*, outras espécies de *Cryptosporidium* como *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. suis*, *C. muris* e *Cryptosporidium* genótipos cervídeo e de macacos, podem infectar pessoas com o sistema imunológico debilitado ou não. Entre estas espécies, *C. meleagridis*, originalmente descrito em aves, tem apresentado um aumento de detecção em pessoas imunocompetentes sendo considerado hoje como um protozoário emergente e, o responsável por 11 % das infecções em indivíduos imunocomprometidos no Reino Unido (MONIS e THOMPSON, 2003; CACCIÓ et al., 2005).

Desta forma, muitos pesquisadores têm sugerido que todas as espécies de *Cryptosporidium* possam ser consideradas como potencialmente infectantes para o ser humano, fator agravante em função dos indivíduos imunocomprometidos e da reconhecida característica zoonótica de algumas espécies de *Cryptosporidium* (FELTUS et al., 2006).

O ciclo das espécies de *Cryptosporidium* é monoxênico, com duas fases de desenvolvimento, uma assexuada e outra sexuada ocorrendo no mesmo hospedeiro. Os oocistos são pequenos, com um tamanho que varia de 4 a 6 μm e que abriga 4 esporozoítos, que são liberados na luz intestinal após a ingestão dos oocistos. *Cryptosporidium* spp. possui alta eficiência de infecção considerando-se, a baixa dose infectante e a rapidez com que os esporozoítos localizam, atacam e invadem os enterócitos (célula hospedeira), colonizando-os com muita habilidade. Na fase assexuada de merogonia eles se multiplicam no interior da célula infectada ou, invadem outras células vizinhas; segue-se então a formação de micro e macrogametócito com fertilização e formação de zigoto (fase sexuada). Nesta fase de esporogonia, uma característica interessante deste protozoário, é a formação de 2 tipos de oocistos: de parede grossa (80,0 %) e de parede fina (20,0 %). Oocistos de parede fina são responsáveis pela auto-infecção e os oocistos de parede espessa são eliminados já infectantes nas fezes do hospedeiro na ordem de 10^8 oocistos/gramas de fezes (FAYER et al., 2004), sendo, portanto a contaminação de outro hospedeiro pela via fecal-oral e podendo ocorrer de forma direta ou indireta.

As formas diretas de transmissão de *Cryptosporidium* spp. são: o contato pessoa-à-pessoa, pessoa-animal (configurando transmissão zoonótica e

comprovada para algumas espécies de *Cryptosporidium*), a atividade sexual e, a inalação dos oocistos.

Na transmissão direta de *Cryptosporidium* spp. envolvendo o ser humano, existem dois principais ciclos bem estabelecidos: o antroponótico e o zoonótico. O primeiro é resultado do contato inter-pessoal, sendo a única via de transmissão para a espécie *C. hominis*. Esta forma de transmissão é um fator epidemiológico importante da criptosporidiose sendo, com frequência a via de transmissão dos surtos registrados em creches. No Brasil, a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em crianças que freqüentam creches, varia entre 1,0 % e 20,0 %, e é apontado como uma das causas mais comuns de diarreia em crianças (ROSE et al., 2002), com registros de surtos epidêmicos de diarreia causados por *C. hominis* (GONÇALVES et al., 2006)

No ciclo zoonótico, a transmissão ocorre em função do contato do homem com outro animal, sendo a principal rota de transmissão para *C. parvum*, genótipo bovino. Ressalte-se que a criptosporidiose é de grande interesse para a Medicina Veterinária, não só por ser uma fonte de dispersão e infecção para o ser humano, mas também porque acarreta grande perda econômica com os animais infectados (RAMIREZ et al., 2004).

Nos Estados Unidos, o gado é freqüentemente parasitado com um sub-genótipo que também acomete o homem (XIAO et al., 2007) e, no Brasil, prevalências de até 72,0 % são detectadas nos rebanhos (EDERLI et al., 2004; BONFIM, 2006). Em suínos, a prevalência desta parasitose é menor: varia de 1,0 % a 7,0 % no Brasil, mas pode chegar até 21,0 % em países como o Canadá e Espanha (NISHI et al., 2000; RAMIREZ et al., 2004). Informações sobre eqüinos

são escassas, porém uma prevalência de 100 % foi observada nos Estados Unidos. Em cavalos, o monitoramento de *Cryptosporidium* spp. é importante em função da parasitose ser assintomática, por causa da atividade recreativa praticada com estes animais e do uso terapêutico (RAMIREZ et al., 2004).

Animais de estimação como cães, gatos e aves são parasitados por *C. canis*, *C. felis* e *C. meleagridis* e *C. baileyi*, respectivamente (RAMIREZ et al., 2004; HUNTER e THOMPSON, 2005). Animais silvestres também são acometidos por *Cryptosporidium* spp. As espécies *C. parvum* e *C. muris* foram detectadas em pequenos mamíferos silvestres da Mata Atlântica brasileira (DALL'OLIO e FRANCO, 2004).

Indivíduos HIV+ e homossexuais masculinos apresentam alta prevalência de *Cryptosporidium* spp. com estudos correlacionando a transmissão da parasitose à prática de sexo anal (ESFANDIARI et al., 1995; PEDERSEN et al., 1996). Infecções pulmonares e a detecção de oocistos no aspirado pulmonar de indivíduos HIV+ e em crianças, evidencia a possibilidade de aquisição desta parasitose por inalação dos oocistos (TZIPORI e WARD, 2002).

Indiretamente, oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem ser adquiridos por vetores, pelo contato com objeto ou superfície contaminada e, pela ingestão de alimento ou água contaminada.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados aderidos ao corpo de baratas da espécie *Periplaneta americana*, inseto altamente antroponótico e que haviam sido capturadas de domicílios com crianças portadoras de criptosporidiose. Registros de oocistos no corpo de moscas e besouros também já

foram feitos, sugerindo que estes insetos possam atuar como disseminadores deste protozoário (FAYER et al., 2000).

Em hospitais e creches a possibilidade de transmissão da parasitose pelo contato com superfície ou objeto contaminado é maior, uma vez que crianças assintomáticas e que utilizam fraldas, podem funcionar como reservatório e fonte de dispersão do protozoário (HUNTER e THOMPSON, 2005).

Os alimentos, principalmente os ingeridos crus como as verduras folhosas, frutas e moluscos marinhos têm sido considerados veículos potenciais de *Cryptosporidium* spp. Surtos epidêmicos de veiculação alimentar de criptosporidiose têm ocorrido em países desenvolvidos ou não (ALI e HIL, 2003). Estes alimentos podem ser contaminados através da fertilização do solo com fezes de outros animais, pelo uso de lodo de esgoto como fertilizante e condicionador de solo, pelos trabalhadores que manipulam o alimento durante a colheita e seu preparo, pelo contato com superfície contaminada onde o alimento é preparado e empacotado ou, pela água de irrigação de baixa qualidade (FAYER et al., 2000).

Nos Estados Unidos cerca de 10,0 % dos casos de criptosporidiose foram adquiridas pelo alimento, e o registro de pelo menos 3 surtos epidêmicos de criptosporidiose associadas ao consumo da bebida à base de cidra de maçã, indica que possíveis problemas nas plantas de pasteurização podem alterar a eficiência deste processo em inativar *Cryptosporidium* spp. (BLACKBURN et al., 2006). Entre 1992 e 2000, na Inglaterra, ocorreram 3.700 casos de veiculação alimentar desta parasitose com 3 mortes registradas (SMITH et al., 2006a).

Mas atualmente é a veiculação hídrica de *Cryptosporidium* spp. considerada a principal forma de transmissão, sendo que a maioria dos 160 surtos epidêmicos os quais ocorreram nos últimos 15 anos tiveram a água como fonte de transmissão (FINNE-RIMNHANEN, 2002).

A dose média infectante (ID_{50}) para a espécie *C. parvum*, com base em um indivíduo adulto e saudável, é de 132 oocistos (CAREY et al., 2004), porém sabe-se que a instalação desta parasitose depende muito de características intrínsecas do hospedeiro como estado imunológico e, do parasito como a distinta virulência dos diferentes isolados. Alguns autores sugerem, por exemplo, que alguns indivíduos possam adquirir a criptosporidiose com a ingestão de apenas 1 oocisto (CAREY et al., 2004; SMITH et al., 2006a). No grande surto de Milwaukee (EUA), a avaliação de amostras de água, indicou contaminação de 0,7 e 13,2 oocistos /100 litros da água distribuída durante os meses de ocorrência do surto (ROSE, 1997).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção manifesta-se com diarreias esporádicas em indivíduos de todas as idades e um quadro agudo em crianças, sendo responsável também pela diarreia dos viajantes. Em humanos apresenta um período pré-patente variando entre 4 a 22 dias e um período patente de 1 a 20 dias. A doença se caracteriza por uma diarreia aquosa podendo conter ou não muco (mas raramente sangue), dores abdominais, perda de peso, náusea, anorexia, fadiga e febre. É auto-limitante no indivíduo saudável e, a severidade dos sintomas ocorre em apenas 1,0 % dos casos, apresentando baixa taxa de mortalidade (0,001 %). Embora relatado em apenas 20,0 % dos casos, a diarreia pode se tornar crônica e persistir por até 4 ou 7 semanas. Crianças com idade

menor que 2 anos e que freqüentam creches são mais susceptíveis a esta parasitose, apresentando sintomas adicionais como aumento da diarreia e conseqüente desidratação (BOLTER-BITZER et al., 2007; CAREY et al., 2004; RAMIREZ et al., 2004).

Pessoas com repetidas exposições à baixas doses do protozoário, poderiam minimizar os sintomas da doença e, apresentar manifestações diarreicas mais brandas, como evidenciado em indivíduos com altos níveis de anticorpo anti-*Cryptosporidium* (HUNTER e THOMPSON, 2005).

Porém, existem grupos específicos de maior risco para a aquisição da criptosporidiose, e o fator imunológico do hospedeiro define o curso clínico da doença: quando uma pessoa apresenta um número de células de defesa CD₄ menor que 200 células/ μl^{-1} , ela apresentará uma infecção severa e persistente (FELTUS et al., 2006), sendo por isso denominado de protozoário oportunista.

Hoje sabemos que crianças que freqüentam creches, pessoas desnutridas, idosos, os que trabalham diretamente com animais de criação e, indivíduos imunocomprometidos (HIV+, transplantados, pessoas em tratamentos quimioterápicos, que fazem hemodiálise ou utilizam corticosteróides e diabéticos), apresentam alto risco de desenvolver diarreia persistente e de necessitarem de atenção médica, quando expostos ao protozoário *Cryptosporidium* spp. Neste grupo, a criptosporidiose torna-se crônica e debilitante, pois pode ocorrer o desenvolvimento de uma diarreia com duração de cerca de 2 meses, um agravamento da sintomatologia, longos períodos de internação e taxas de mortalidade variando entre 50,0 e 60,0 % (BOLTER-BITZER et al., 2007). A criptosporidiose extra-intestinal é também possível neste grupo de indivíduos e

nestes casos, o protozoário se aloja no estômago, pâncreas, trato biliar ou pulmão (CAREY et al., 2004; FAYER, 2004).

Com a introdução da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART) a partir de 1997, houve uma diminuição do número de casos severos de criptosporidiose, entre os pacientes infectados por HIV (CCACIÒ et al., 2003; FAYER, 2004). Crianças imunocomprometidas também são frequentemente infectadas sendo que a prevalência aumenta à medida que crescem (BOLTER-BITZER et al., 2007). A região sudeste brasileira possui 67,8 % dos casos de SIDA do país e a maior taxa de crianças portadoras do vírus HIV. Segundo o Ministério da Saúde a prevalência global da criptosporidiose em indivíduos portados de HIV é de 0,7 %. Um estudo foi realizado para verificar o papel dos enteropatógenos em crianças HIV+, e *C. parvum* foi o mais comum parasito presente em 62,0 % das amostras avaliadas (ROSSIT et al., 2007) e *C. hominis*, a espécie mais detectada em crianças e adultos infectados com HIV (SILVA et al., 2006).

Brasileiros que passaram por transplante renal ou que faziam hemodiálise foram 34,8 e 25,0 % respectivamente, positivas para *C. parvum* (JABUR et al., 1996; TURKCAPAR et al., 2002) e, pacientes em tratamento quimioterápico nas Filipinas mostraram uma taxa de 28,3 % de positividade (RIVERA et al., 2005).

Mesmo com mais de 150 fármacos estudados, poucos tem sido capazes de reduzir os sintomas e controlar a parasitose e, embora a nitazoxanida tenha sido liberada para uso pediátrico, sua eficácia e segurança em adultos saudáveis e indivíduos imunocomprometidos ainda não foi estabelecida, mantendo-se ainda a hidratação oral ou intravenosa como uma importante ação no tratamento da criptosporidiose (RAMIREZ et al., 2004). A imunoterapia parece ser uma

alternativa promissora e, embora exista variabilidade de resultados nas pesquisas, o uso do colostro hiperimune, de uma forma geral, reduz a infecção trazendo melhora aos pacientes tratados. Vacinas utilizando DNA têm induzido resposta celular e humoral em camundongos e primatas não humanos e são vistas, como uma opção valiosa para controlar a contaminação ambiental, pois reduziria a eliminação de oocistos pelo hospedeiro (JENKINS, 2001; BOLTER-BITZER et al., 2007).

Sem um fármaco efetivo, é importante ressaltar que a possibilidade de transmissão hídrica deste parasito é um fator impactante para a saúde pública, uma vez que uma expressiva parcela de pessoas imunocomprometidas pode morrer devido à severa desidratação e perda de peso ocasionada pela infecção (PENG et al., 1997).

Como este protozoário é resistente à cloração, a remoção destes organismos depende basicamente de um processo físico, sendo que em uma ETA que utiliza o processo convencional de tratamento de água (baseado em floculação, coagulação, sedimentação e filtração), *Cryptosporidium* spp. é susceptível à remoção nas etapas de decantação e filtração, onde a remoção desses protozoários em geral é de 99,0 % (BUSTAMANTE et al., 2001; DAÍ e HOZALSKI, 2002). Porém, um estudo realizado na Espanha detectou *Cryptosporidium* spp. na água final a ser distribuída a população e na torneira dos domicílios, com uma concentração de ≥ 8 oocistos /100 litros, indicando que o tratamento de filtração rápida e cloração utilizado pela ETA avaliada não foram eficientes em remover totalmente oocistos (CARMENA et al., 2007).

A característica da compressibilidade que permite aos oocistos reduzirem seu tamanho (4 a 6 μm) para 2 a 4 μm quando expostos à altas pressões, podem permitir que os oocistos atravessem os filtros de uma ETA convencional (HSU e YEH, 2003; CAREY et al., 2004). Além disso, *Cryptosporidium* spp. não possui nenhum bioindicador de contaminação fecal como *Escherichia coli*, coliformes totais e *Clostridium perfringes* (HÄNNINEN et al., 2005) e, embora a turbidez seja um indicador da eficiência do tratamento de água e sua remoção tenha correlação com a remoção de oocistos, este parâmetro físico-químico não é uma referência para a presença deste protozoário (CARMENA et al., 2007).

Acrescenta-se a estes fatores, a grande resistência ambiental, resultado de uma parede de dupla camada, composta por proteínas e quitina, que permite a dispersão e a manutenção da infectividade de oocistos no ambiente, sendo estes, questões preocupantes em relação a este protozoário, para as indústrias produtoras de água em todo o mundo.

Oocistos permanecem infectantes por 6 meses em água doce a uma temperatura variando entre 0 e 20°C; na água do mar a infectividade se mantém por 40 dias a 18 °C e 35,0 % de salinidade (FAYER, 2004). Oocistos expostos -70 °C por 1 hora, foram capazes de causar infecção em camundongos, sendo que a inativação ocorre após um minuto de exposição à temperatura de 73 °C, (FAYER, 2004). Em águas naturais os oocistos tendem a permanecerem livres, porém, a grande concentração de partículas lançadas nos mananciais via descarga de esgoto bruto ou tratado, pode alterar esta característica e conseqüentemente a dispersão, a sobrevivência e a remoção destes protozoários durante o tratamento da água (MEDEMA, et al., 1998; DAÍ e BOLL, 2006).

Infere-se que a velocidade de sedimentação de oocistos em uma coluna de água com ausência de movimento é de aproximadamente $0,84$ e $0,36 \mu\text{m s}^{-1}$, respectivamente e, com esta baixa velocidade de sedimentação e o fato de se deslocarem livremente em um corpo d'água, as formas infectantes podem percorrer longas distâncias até serem armadilhadas por alguma barreira ambiental ou agregada a uma partícula que promoverá sua sedimentação mais rápida (DAI e BOLL, 2006). A idade, a carga de superfície e a hidrofobicidade são características que influenciam a adesão (DAI et al., 2004); oocistos que já sofreram algum estresse ambiental se agregam mais facilmente às partículas (DAI e BOLL, 2006). Porém, ainda hoje não há um completo entendimento de como os oocistos interagem química e fisicamente sob as condições encontradas nos sistemas de tratamento de água e nos diferentes mananciais.

3. *Giardia* spp.

Descrita pela primeira vez por Anton van Leeuwenhoek em 1681, *Giardia duodenalis* é outro importante protozoário de veiculação hídrica. Também conhecido como *G. lamblia* e *G. intestinalis*; foi descrito mais detalhadamente em 1859 por Vilem (ADAM, 2001). Diversas técnicas analíticas têm mostrado *Giardia* spp. como um organismo primitivo, com evidências que sugerem sua evolução e a perda de muitas das características de seus ancestrais e, como um organismo eucarionte, discute-se que a *Giardia* spp. seja o elo entre os organismos procariontes e os eucariontes (ALI e HILL, 2003).

Pertencente à ordem Diplomonadida e família Hexamitidae, o gênero *Giardia* teve as descrições das espécies inicialmente, baseadas apenas na

especificidade pelo hospedeiro, mas, atualmente os taxonomistas utilizam a forma e a posição dos corpos medianos, a forma dos trofozoítos, o tamanho do disco ventral, entre outras características possíveis de observação em função da técnica de microscopia eletrônica (MONIS e THOMPSON, 2003). Entre 1920 e 1930, mais de 50 espécies de *Giardia* foram descritas e, em 1952, Filice propôs uma reavaliação das espécies feita com base na morfologia e não na duvidosa especificidade pelo hospedeiro (THOMPSON, 2004).

Muitas espécies de *Giardia* habitam o trato intestinal de quase todas as classes de vertebrados e, somente *G. duodenalis* é encontrada em humanos e na maioria dos mamíferos domésticos e silvestres (THOMPSON, 2004). Atualmente, com um grupo de 6 espécies reconhecidas (Tabela 2), *G. duodenalis* é considerada um complexo de espécies com morfologia similar, mas com variedades genéticas e fenotípicas, e diferença na especificidade pelo hospedeiro. *Giardia* spp. possui ainda, vários grupos designados assembléias, que são geneticamente distintos e sabidamente infectantes para vários hospedeiros. Mesmo com as técnicas moleculares atuais, ainda tem sido difícil interpretar a extensa variabilidade genética dentro da taxonomia de *G. duodenalis* sendo que, mesmo com a possibilidade de manutenção do parasito em culturas axênicas, não são todos os isolados de *G. duodenalis* que se estabelecem nestas culturas *in vitro* e, esta inabilidade em ampliar todos isolados obtidos dos diversos hospedeiros, tem sido uma das maiores limitações no conhecimento da epidemiologia e transmissão de *Giardia* spp. (ALI e HILL, 2003; THOMPSON 2004; BERTRAND e SCHWARTZBROD, 2007). Os isolados de *G. duodenalis* são classificados em 7 assembléias e, somente nas assembléias A e B encontram-se

os genótipos que acometem o homem, podendo ocorrer infecções concomitantes; as demais assembléias, de C a G, são restritas a outros animais (ALI e HILL 2003; GUY et al., 2004; THOMPSON 2004).

Tabela 2. Taxonomia das espécies de *Giardia* spp. e seus principais hospedeiros.

Espécies	Principais hospedeiros
<i>Giardia duodenalis</i> (Assembléia A)	Homem e outros animais
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia B)	Homem
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia C)	Canídeos
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia E)	Bovinos e outros animais de criação
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia F)	Felinos
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia G)	Roedores
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. ardeae</i>	Pássaros
<i>G. microti</i>	Roedores e canídeos
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Pássaros

Fonte: Cacció et al., 2005.

A identificação destas assembléias envolve marcadores como os genes que codificam o rRNA e, marcadores como os genes que codificam a proteína β -giardina que são utilizados na diferenciação de sub-genótipos dentro das assembléias (ALI e HILL, 2003). A quantidade e qualidade das ferramentas moleculares para genotipagem de *Giardia* spp. limitam o entendimento da epidemiologia da giardiose humana, sendo que alguns resultados só podem ser alcançados mediante interferência estatística (MONIS e THOMPSON, 2003; CACCIÓ et al., 2005). Estudos de transmissão cruzada são limitados apenas para

determinar a especificidade pelo hospedeiro ou diferenças de genótipos, não caracterizam isolados e, o uso de altas doses infectantes também é um fator restritivo, pois não corresponde ao que ocorre naturalmente (MONIS e THOMPSON, 2003).

Reconhecido na década de 70 como um organismo patogênico, somente 10 anos mais tarde a OMS incluiu-o na lista de parasitos patogênicos (FAUBERT, 2000). Protozoário flagelado, não invasivo e binucleado possui uma forma de resistência ambiental conhecida por cisto, de tamanho variando de 8 a 12 μm , que são eliminados nas fezes do hospedeiro, na ordem de até 10^6 /gramas de fezes (FRICKER e CRABB, 1998; THOMPSON, 2004).

Do cisto é eliminado o excizoíto, forma de vida curta que logo após sua liberação, se diferencia em trofozoíto, estrutura ativa que se adere à luz intestinal pelo disco ventral e se multiplica por divisão binária. Esta divisão se completa em 12 horas e teoricamente, a ingestão de um único organismo pode resultar em 10 dias, em mais de 1 bilhão deles (ROCKWELL, 2003); em resposta a sinais do hospedeiro, os trofozoítos se encistam e são eliminados nas fezes do hospedeiro.

Assim como *Cryptosporidium* spp., a rota de transmissão da *Giardia* spp. também é fecal-oral e de forma direta ou indireta. A transmissão pelo contato inter pessoal e pela atividade sexual são formas de aquisição da giardiose. Em creches, onde o contato direto pessoa à pessoa é uma importante forma de transmissão, a forma assintomática da giardiose pode chegar à taxa de 80,0 %, fazendo destes indivíduos um reservatório e uma importante fonte de dispersão da infecção (FAUBERT, 2000), uma vez que a introdução desta parasitose em um local pode ser feita por apenas uma única criança, se expandindo rapidamente

para o restante do grupo (KATZ et al., 2006). *G. duodenalis* foi descrita como o protozoário mais freqüente em creches avaliadas no Estado de São Paulo e, mais prevalente em crianças de 0 a 4 anos (CARVALHO et al., 2006).

Apenas em homossexuais masculinos, a transmissão sexual da giardiose foi registrada (TESSIER e DAVIES, 1999).

A transmissão zoonótica de *G. duodenalis*, é restrita apenas para os genótipos AI e BIII das assembléias A e B, respectivamente (THOMPSON, 2004). Durante levantamento da presença de *Giardia* spp. em humanos e em cães de uma mesma comunidade, foi possível observar que todas as cepas isoladas dos humanos pertenciam à assembléia A ou B e, todas as cepas isoladas dos cães pertenciam à assembléia C e D, com exceção de um único cão, que apresentou infecção múltipla. A caracterização deste isolado canino (baseado na avaliação de 3 diferentes *locus* gênicos), colocou-o dentro do agrupamento genético dos isolados humanos: assembléia A e B. Esta evidência zoonótica, está baseada na forte associação entre a prevalência de *Giardia* spp. em humanos e a presença no cão, todos em um mesmo domicílio (THOMPSON, 2004; MACPHERSON, 2005). É admitido que em comunidades com inadequadas condições de higiene, alguns genótipos de *Giardia* spp. possam circular entre o homem e o cão, porém não é claro quem é o reservatório primário neste contexto (TRAUB et al., 2004; HUNTER e THOMPSON, 2005).

Embora existam relatos de animais silvestres, principalmente mamíferos aquáticos comumente infectados com *Giardia* spp., existem poucas evidências de que eles tenham sido a fonte de contaminação nos surtos epidêmicos veiculados pela água (THOMPSON, 2004). Estudos com castores e primatas não humanos

indicam que a rota de transmissão pode ser inversa, ou seja, a fonte de infecção de *Giardia* spp. para estes animais, foi de origem humana (CACCIÓ et al., 2005; THOMPSON, 2004; HUNTER e THOMPSON, 2005).

Porém, a ocorrência de isolados morfológicamente semelhantes a *G. duodenalis* e a associação de animais infectados com epidemias de veiculação hídrica em humanos, levou em 1979 a OMS, a classificar *Giardia* spp. como um parasito zoonótico (THOMPSON, 2004).

As formas indiretas de aquisição da giardiose são através de insetos vetores, objetos ou superfície contaminados e, pela ingestão de cistos presentes na água ou alimentos contaminados. Cistos de *Giardia* spp. foram recuperados do exoesqueleto de moscas que habitavam ambientes com pouca higiene, indicando a possibilidade desta forma de transmissão (ALI e HILL, 2003). Creches, hospitais e ambientes pouco higienizados podem facilitar a contaminação pelo contato com objetos e superfícies.

Frutas e verduras consumidas cruas e moluscos de água doce ou marinha, são veículos potenciais deste parasito. Dos 357 mil casos de doenças parasitárias por veiculação alimentar que ocorreram nos Estados Unidos, *Giardia* spp. junto com *Cryptosporidium* spp. foram a causa de cerca de 64,0 % destes surtos onde foram registradas 700 hospitalizações e 8 mortes (SMITH et al., 2006a). Porém, a veiculação hídrica dos cistos é a principal forma indireta de transmissão de *Giardia* spp. Na última década nos surtos epidêmicos de giardiose que acometeram os Estados Unidos, a água foi o veículo de transmissão dos cistos, sendo que em 9,4 % a ingestão do protozoário ocorreu em função do contato com águas

recreacionais e, em 16,2 % a causa foi a ingestão dos cistos pela água potável contaminada (BERTRAND e SCHWARTZBROD, 2007).

Com uma dose média infectante (ID_{50}) de 10 a 100 cistos, acredita-se que até a ingestão de 9 cistos seja suficiente para a instalação da giardiose, onde as manifestações clínicas variam desde formas assintomáticas até diarreia crônica. Os sintomas mais comuns são dores abdominais, náusea, seguido de severa diarreia aquosa, má absorção e perda de peso. A má absorção de gorduras, vitamina B₁₂ e do açúcar d-xilose é documentada em pacientes com diarreias crônicas (ADAM, 2001; MÜLLER e von ALLMEN, 2005).

Associada a viagens para países em desenvolvimento, *Giardia* spp. é o parasito intestinal mais diagnosticado na América do Norte e com estimativas de que 20,0 % da população mundial esteja parasitada (ROCKWELL, 2003).

O desenvolvimento cognitivo também é afetado sendo que esta parasitose contribui de uma forma geral, na queda de 15 pontos do Quociente de inteligência (QI), sendo necessárias intervenções pedagógicas para promover o desenvolvimento cognitivo da criança (ALI e HILL, 2003).

Muniz-Junqueira e Queiroz (2002) comprovaram a associação da giardiose com a desnutrição energética-proteica e avitaminose em crianças brasileiras, onde a prevalência deste parasito foi de 30,4 %. Alguns trabalhos mostram uma forte associação da Assembléia A com diarreia intermitente e, da assembléia B com diarreia persistente, fato observado em crianças com até 5 anos de idade, que desenvolvem mais rapidamente diarreia quando parasitadas por isolados da assembléia A, do que as crianças com isolados da assembléia B (MONIS e THOMPSON, 2003; ALI e HILL, 2003; CACCIÓ et al., 2005).

A patogenicidade da giardiose é multifatorial, mas ainda não é completamente entendida; os trofozoítos parecem causar um dano direto à bordadura em escova e à mucosa do intestino, em função da sua adesão; a resposta imune induzida aumentaria a produção de secreção e fluído que danificariam o intestino, e ainda, alterações do conteúdo biliar e da flora do duodeno facilitariam a diarreia. Um dos fatores fundamentais é a alteração da permeabilidade do epitélio, induzido por produtos secretados pela *Giardia* spp. Este aumento da permeabilidade do epitélio leva a uma reação inflamatória podendo exacerbar um quadro de alergia (MÜLLER e ALMEN, 2005) e, este aumento da permeabilidade acarreta ainda, alterações na digestão e absorção, devido à injúria na bordadura em escova e indução de apoptose das células intestinais (THOMPSON, 2004).

O grau da patologia da giardiose em pacientes com o sistema imunológico comprometido é semelhante ao dos indivíduos imunocompetentes. Crianças com severa deficiência de células T não foram mais susceptíveis à giardiose e, quando adquirida a parasitose, tiveram o mesmo grau de morbidade que crianças imunocompetentes. Estes resultados indicam que a deficiência de células CD₄, por exemplo, não torna o indivíduo mais susceptível à infecção deste protozoário (FAUBERT, 2000).

O tratamento da giardiose é feito em geral com componentes como o albendazol e o nitrofuram, que alteram a aderência e causa o desprendimento do parasito do epitélio e, nitazoxamida que exibe efeito semelhante ao metronidazol (bloqueio da síntese de DNA) (ALI e HILL, 2003; PÉREZ-ARRIAGA et al., 2006). Mesmo sendo disponíveis e eficientes no combate a giardiose, estes fármacos

causam efeitos colaterais que acarretam a interrupção do tratamento, possibilitando que os parasitos desenvolvam resistência a elas (SAVIOLI et al., 2006). Crianças nascidas de mãe não-imune para *Giardia* spp. apresentaram um maior risco de adquirir a infecção nos primeiros meses de vida e de desenvolverem sintomas mais severos, do que as nascidas de mães imunes as quais transferiram esta proteção natural via leite materno (TELLEZ et al., 2003). A vacinação mostra-se como uma alternativa ao tratamento medicamentoso. Comercialmente vendida, cães e gatos vacinados apresentaram redução no tempo de eliminação e no número de cistos eliminados (OLSON et al., 2000).

Frequentemente detectados em amostras hídricas, de uma forma geral, cistos de *Giardia* spp. sobrevivem por menos tempo na água e são menos resistentes aos processos de desinfecção, quando comparado aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. Ainda assim, podem sobreviver neste ambiente por até 2 meses a 8°C (CACCIÓ et al., 2003), porém, são facilmente armadilhados nos filtros de uma ETA em função do seu tamanho (8 a 12 µm) (CACCIÓ et al., 2005; SMITH et al., 2006a). A maneira de contaminação de um manancial com cistos de *Giardia* spp. é semelhante à contaminação por oocistos (fezes nas pastagens, esterco e do lodo de esgoto utilizado em áreas agrícola e, descarga de esgoto *in natura* ou tratado).

4. Fontes de contaminação de mananciais com oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

Os patógenos podem alcançar os recursos hídricos pela drenagem de fezes e do lodo de esgoto usado na agricultura e, em função de escoamentos

superficiais provocados por fortes chuvas. Porém, é a disposição deste resíduo em um corpo d'água uma das principais fontes de contaminação. Além do lançamento do esgoto *in natura*, a disposição inadequada de esgoto tratado nos mananciais é uma importante fonte dos patógenos no ambiente (OTTOSON et al., 2006).

Surtos epidêmicos de veiculação hídrica, já ocorreram em várias partes do mundo, mesmo em países desenvolvidos onde o tratamento da água praticado com tecnologia sofisticado e amplamente difundido (CLANCY, 2003). Muitos destes surtos tiveram o esgoto doméstico confirmado como sendo a fonte poluidora dos recursos hídricos (GAJADHAR e ALLEM, 2004; MACPHERSON, 2005). Oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. são freqüentemente detectados, com concentrações variáveis, em amostras de esgoto bruto ou tratado: de 10^2 a 10^4 oocistos/litro e 10^3 a 10^5 cistos/litro e, 10 a 10^3 oocistos/litro e cistos/litro, respectivamente (CARRARO et al., 2000). A presença destes protozoários já foi detectada até mesmo em efluentes de esgoto que passaram por um tratamento em nível terciário (CLANCY, 2003; MONTEMAYOR et al., 2005).

A inclusão de uma etapa de desinfecção do esgoto tratado antes de ser disposto no ambiente, também não assegura a completa inativação dos oocistos e cistos, uma vez que estes protozoários são resistentes aos desinfetantes à base de cloro e, os resultados de inativação com a desinfecção por UV, por exemplo, que é considerado o processo de desinfecção mais promissor, dependem muito, da dose, do tempo de exposição e da qualidade do efluente a ser desinfetado (ANDREADAKIS et al. 1999; BELOSEVIC et al., 2001; HIJNEN et al., 2006).

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. não possuem correlação estatística com bioindicadores, nem mesmo o tratamento terciário de esgoto se mostra 100 % eficiente em remover e/ou inativá-los (HÄNNINEN et al., 2005, MONTEMAYOR et al., 2005). Como todo o esgoto tratado tem como destino final um corpo hídrico, a análise direta de oocistos e cistos em amostras de efluente de ETE é necessária, principalmente se a descarga do esgoto for realizada em um receptor que será utilizado como fonte de captação de água, para recreação ou para uso agrícola.

Além disso, a avaliação da infectividade das formas encontradas neste tipo de amostra é que irá fornecer informações sobre a eficiência dos processos e assim, o real risco para a saúde pública.

5. Esgoto

O esgoto é uma complexa suspensão e solução que contém uma ampla variação de sólidos ou partículas, como organismos e componentes minerais, com propriedades físico-químicas, que promovem a sua estabilidade e caracterizam os diferentes tipos (BAURÈS et al., 2004). Com uma composição fracionada de 99,9 % de água e 0,1 % de sólidos, é nesta pequena fração sólida, que podem se encontrar os patógenos, que o esgoto precisa ser tratado antes de ser lançado em um corpo receptor. Em função de sua origem, pode ser classificado como sanitário (comercial ou doméstico) ou industrial. O esgoto industrial possui uma composição variável de acordo com o produto produzido na indústria e deve receber um tratamento específico, ainda na área industrial, antes de ser lançado a um corpo receptor. Já o esgoto comercial e doméstico consiste basicamente da água

resultante de pias, de banhos, da descarga dos vasos sanitários e das lavagens realizadas nas edificações onde são originados. No Brasil, o último levantamento do IBGE de 2002 aponta que dos cerca de 5.500 municípios, somente 20,0 % deles tratam o esgoto produzido, o que significa que a maior parte (80,0 %) produzida no país é lançada *in natura* no ambiente.

Os principais parâmetros que caracterizam o esgoto sanitário de origem doméstica e que auxiliam no monitoramento dos processos de tratamento são: a) *demanda bioquímica de oxigênio* (DBO): que indica a quantidade de oxigênio consumida pelos microorganismos presentes no esgoto para oxidar a matéria orgânica em condições específicas. No esgoto doméstico variam entre 200 e 300 mg de oxigênio/litro; b) *sólidos totais*: de origem orgânica ou inorgânica e variam entre 350 e 1.200 mg/litro; c) *nitrogênio*: varia de 20 e 80 mg/litro tanto na sua forma orgânica, amoniacal e inorgânica e, d) *fósforo*: concentração variando entre 5 e 20 mg/litro. Os índices biológicos, quando avaliados são baseados nas coliformes totais e termotolerantes e, índices parasitológicos, embora presentes, não fazem parte dos parâmetros que caracterizam este resíduo.

6. Tratamento do esgoto

O tratamento de esgoto em geral, é descrito em função de diferentes graus de remoção de matéria orgânica e/ou inorgânica que, em ordem crescente, são classificados em: preliminar, primário, secundário e terciário ou avançado (MUJERIEGO e ASANO, 1999). A tecnologia do tratamento de esgoto industrial e doméstico cresceu nestes últimos 100 anos, mas ainda é importante aprimorar estes processos levando em conta sua eficiência e seu custo de construção e

operacional, uma vez que em funcionamento, os resultados do tratamento ficam abaixo do que o esperado pela tecnologia inicialmente escolhida e empregada (OLIVEIRA e von SPERLING, 2005b; ZHAO et al., 2007).

No tratamento de esgoto, processos físicos, químicos e biológicos são envolvidos. Na etapa física, realizado por meio de gradeamento, sedimentação, flutuação, flotação e filtração, apenas as substâncias que não estão dissolvidas no esgoto é que são removidas. As substâncias dissolvidas e as suspensões coloidais precisam ser eliminadas por meio de processos que transformem as moléculas em partículas, flocos, que sejam depuradas fisicamente ou transformando-as em gases para serem liberados para atmosfera.

Uma forma de promover a floculação de substâncias dissolvidas e coloidais presentes no esgoto é através de processo biológico, realizado por bactérias anaeróbias ou aeróbias. Exemplos destes tratamentos são: lagoas facultativas, leitos cultivados, reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB), e, o processo lodo ativado aeróbio, que podem ser utilizados de forma seqüencial, combinados ou com modificações (AIYUK et al., 2006). Embora novas tecnologias como filtração em dupla membrana, ultrafiltração e osmose reversa estejam em desenvolvimento e pesquisas com resultados preliminares satisfatórios, ainda apresentam altos custos (LEE et al., 2007; TAM et al., 2007). Assim, muitas ETE utilizam os processos biológicos como forma de tratamento.

O tratamento anaeróbio foi muito investigado nas últimas décadas, com ETE sendo implantadas em todo mundo principalmente em países tropicais, uma vez que este processo não tem se mostrado eficiente em climas temperados (HAFIANE e HAMOURI, 2005). O reator UASB, é um processo anaeróbio bem

avaliado que apresenta vantagens ao uso isolado do lodo ativado, se combinado à outros tratamentos que completam a remoção da matéria orgânica (SOUZA et al., 2004; SUMINO et al., 2007; TANKUKAR et al., 2007).

A degradação por bactérias anaeróbias apresenta as vantagens de produzir uma menor quantidade de resíduo (5 a 10 vezes menor que o tratamento aeróbio), de gerar gás metano, ter um baixo custo de construção, pois necessita de uma área pequena para sua instalação e de manutenção, porque não consome energia elétrica, uma vez que não utiliza bombas ou aeradores (HAFIANE e HAMOURI, 2005). Como desvantagem, há a necessidade de algumas semanas e até meses, para estabilizar a matéria orgânica presente no esgoto, além de produzir maus odores, reduzir a matéria orgânica em torno de 60,0 a 80,0 % e, a remoção de patógenos como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. ser menor quando comparado com o tratamento aeróbio (OTTOSON et al., 2006).

Muito utilizado, o tratamento aeróbio reduz mais de 80,0 % da DBO sem produção de odores e a estabilização da matéria orgânica pode ocorrer em algumas horas, sendo este tempo reduzido quanto maior a temperatura. Às desvantagens incluem o alto custo das instalações, pois grandes áreas são necessárias, o grande gasto de energia em função do uso de bombas para retirada do lodo excedente, para retorno do lodo e com os aeradores. Essas operações são responsáveis por 54,0 a 97,0 % do consumo de uma ETE, dependendo do tipo e uso. Soma-se a isso a regular manutenção e operação de equipamentos complexos para garantir a eficiência do funcionamento, porém, a alta produção de resíduos, talvez seja o principal problema das ETE que operam com o sistema de lodo ativado (TANDUKAR et al., 2007).

A tendência atual para o tratamento é o conceito de integração entre os vários processos: o químico, com etapa de floculação e coagulação; o anaeróbio e aeróbio para degradação da matéria orgânica e o físico, com uma etapa de sedimentação, com a finalidade de solucionar alguns problemas, como os citados e, equilibrar o custo de instalação e manutenção com a eficiência no tratamento do esgoto doméstico (FIKAR et al., 2005; AIYUK et al., 2006; SUMINO et al., 2007; TANKUKAR et al., 2007).

Em 1914, dois pesquisadores ingleses observaram que promovendo a aeração de águas residuárias, o resultado era a remoção de material orgânico e formação de flocos macroscópicos que por sedimentação simples, poderiam ser separados da fase líquida. Notaram ainda que a adição desses flocos a outro volume de água, acelerava o processo de remoção do material orgânico (www.tratamentodeagua.com.br). Este processo ficou conhecido como lodo ativado, pois a degradação da matéria orgânica presente no esgoto bruto é feita por microorganismos que compõem o floco, sendo utilizado pela primeira vez, em larga escala, em 1922.

O floco biológico é formado por bactérias que se agregam e, aderidos ou não a este floco, estão os fungos, os protozoários, os rotíferos, os nematóides e os anelídeos, ficando a composição assim estabelecida: 95,0 % da biomassa do lodo é formada pelas bactérias e os 5,0 % restantes por estes outros organismos, sendo que destes, os protozoários são predominantes (CHEN et al., 2004). A comunidade de protozoários presentes no lodo ativado é muito sensível às variações ambientais e, eventuais mudanças podem alterar a cadeia alimentar deste ecossistema artificial, afetando o desempenho do tratamento do esgoto. Em

função disto, os protozoários não patogênicos podem indicar as condições de operação de uma ETE que opera com o processo de lodo ativado (NICOLAU et al., 2001; CHEN et al., 2004). Além da degradação da matéria orgânica, devido à complexidade de interações existente no floco, as bactérias fixam uma quantidade variável de organismos dentro do floco (SANIN et al., 1994; NICOLAU et al., 2001) incluindo possíveis patógenos presentes no esgoto bruto.

O grande problema nas ETE que operam com tratamento por lodo ativado, é que, devido à contínua entrada de esgoto nos tanques de aeração e conseqüente crescimento do lodo, há a necessidade de se retirar periodicamente o lodo excedente e, estima-se que cada habitante produza cerca de 160 a 190 g. de lodo/dia (ALÉM SOBRINHO, 2001), gerando uma grande preocupação com a disposição final deste resíduo. A disposição em aterros sanitários apresenta um alto custo de transporte e manutenção; a liberação em oceanos rios e lagos é prática proibida e, a incineração gera gases poluentes (SILVA et al., 2001). Assim, uma alternativa muito estimulada é a disposição na agricultura por ser um bom condicionante e fertilizante do solo, em função do elevado teor de matéria orgânica e nutriente como nitrogênio, fósforo (ANDREOLI e CARNEIRO, 2002; SILVA et al., 2001), porém, esta alternativa trás risco a saúde pública, uma vez que muitos patógenos ficam retidos no floco podendo contaminar o solo e mananciais próximos à área de aplicação (BONATTI, 2007).

Antes da disposição, o lodo pode ser desaguado artificialmente por meio de centrifugas e uso de polímeros, sofrer um tratamento por calagem ou por radiação com luz ultravioleta (UV), logo após a sua retirada do tanque de aeração. Em uma

avaliação do desempenho, 166 ETE nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, que utilizam diferentes processos de tratamento, o lodo ativado, foi o mais eficiente em remover a matéria orgânica, sendo que este desempenho foi mantido mesmo quando a estação trabalhou com variações de carga e tempo de detenção hidráulico (OLIVEIRA e von SPERLING, 2005a e b). Porém, o desempenho destas estações foi baseado em parâmetros físico-químicos como DBO, Demanda química de oxigênio (DQO) e Sólidos suspensos totais (SST) e, a parte biológica, concentrada na detecção de coliformes totais e termotolerantes, carecendo de uma investigação parasitológica como ovos de helmintos e/ou cistos e oocistos de protozoários.

O tratamento de esgoto que promove uma maior remoção de patógenos é o que ocorre em nível terciário, que tem a finalidade de inativar patógenos e eliminar toda a matéria orgânica, além de nutrientes como nitrogênio e fósforo. Esta remoção e inativação são realizadas, por exemplo, com a adição de coagulação química, filtros de areia, filtros de carvão mineral, leitos cultivados e uma etapa de desinfecção, instaladas logo após a etapa de sedimentação proveniente do tratamento secundário (MONTEMAYOR et al., 2005). Embora o tratamento terciário aumente a eficiência de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. do esgoto, a presença destes protozoários já foi detectada no efluente resultante deste tratamento avançado (ROBERTSON et al., 2000; CLANCY, 2003; MONTEMAYOR et al., 2005).

7. Técnicas de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto

Com o aumento no número de surtos epidêmicos de protozoários por veiculação hídrica, metodologias para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras hídricas foram padronizadas e validadas, porém, adotar simplesmente a metodologia utilizada para análise da água, na pesquisa da ocorrência destes protozoários em amostras de esgoto não é possível. Assim, em função das dificuldades inerentes face à composição da amostra, como a rica variedade de microorganismos e características orgânicas e inorgânicas, existe a necessidade de adaptações das metodologias existentes, como por exemplo, dos métodos utilizados nas análises clínicas (McCUIN e CLANCY, 2005).

Robertson et al. (2000) realizaram um extensivo trabalho metodológico para detecção de oocistos e cistos em amostras de esgoto (tratado ou não) analisando as técnicas de flutuação por solução saturada em sacarose, clarificação com éter, a combinação de ambas e a ausência da etapa de purificação. Os autores concluíram que para as diferentes amostras de esgoto (tratado ou não) há necessidade de metodologias diferentes e, com as devidas adaptações, os resultados na recuperação dos oocistos e cistos são mais eficientes.

No Brasil, Dias Júnior (1999) e Farias et al. (2002) analisaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ou cistos de *Giardia* spp. em águas superficiais e de esgoto, utilizando as técnicas de floculação em carbonato de cálcio, filtração em membrana e dissolução da membrana filtrante. Porém, em

decorrência de uma grande concentração de partículas no esgoto, que impacta rapidamente a membrana, o uso delas ficou restrito ao esgoto tratado.

As metodologias de concentração e purificação baseadas na clarificação com éter e na flutuação em solução saturada de sacarose, foram eficientes em recuperar oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de lodo ativado, com um melhor desempenho para o primeiro método em recuperar os cistos e sem diferença estatística na recuperação de oocistos (SANTOS et al., 2004). Metodologias para detecção destes protozoários em lodo de esgoto a ser utilizado na agricultura, também foram adaptadas por Bonatti et al. (2007).

Embora a técnica de filtração em membranas para amostras de esgoto bruto, não seja adequada devido à rápida saturação da membrana, o uso de um sistema de filtração em membrana, já utilizado nas ETA para detecção de bactérias, tem apresentado bons resultados na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto tratado (CANTUSIO NETO et al., 2006). As técnicas realizadas nos trabalhos acima citados são de baixo custo, simples e eficiente, o que viabiliza o fomento de pesquisas de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. nos diferentes tipos de amostras de esgoto.

A etapa de visualização destes protozoários feita com reação de imunofluorescência direta (RID) utilizando-se anticorpos monoclonais, embora onerosa, significa uma eficiência de 12 vezes maior quando comparada com as técnicas comuns de coloração para oocistos e cistos (CLANCY et al., 1999). Esta técnica torna os resultados mais precisos, há a necessidade de pessoal técnico

treinado em função da possibilidade de reação cruzada com algas ou leveduras presentes na amostra.

8. Eficiência dos tratamentos de esgoto na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

A remoção de patógenos ocorre a partir do tratamento do esgoto em nível secundário e, sabe-se que os tratamentos biológicos convencionais não são totalmente eficientes na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. com valores muito variáveis de eficiência sendo relatada na literatura.

Uma remoção de 80,0 % de oocistos do esgoto bruto foi obtida com o uso de reatores biológicos com biomassa de algas (ARAKI et al., 2001). Bukhari et al. (1997) ao avaliarem 3 estações de tratamento, obtiveram taxas de remoção de cistos de *Giardia* spp. variando de 26,0 a 71,0 %, máxima semelhante à observada por Payment et al. (2001) onde a taxa de remoção de cistos foi de 79,0 %. Protozoários ciliados (não patogênicos) presentes em leitos cultivados (*wetlands*) apresentaram favoráveis taxas de predação sobre oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., sendo que a taxa de predação varia em função da espécie do predador (STOTT et al., 1997; STOTT et al., 2001).

Índices maiores de eficiência foram observados por Wiandt et al. (2000) ao avaliarem a eficiência de 5 ETE francesas que operavam com o processo de lodo ativado. Todas as amostras de afluente (esgoto bruto) foram positivas para cistos de *Giardia* spp. e a taxa de remoção variou de 99,5 a 99,8 %. Taxas inferiores foram observadas por Robertson et al. (2006): apenas 50,0 % dos oocistos e 80,0

% dos cistos foram removidos, em ETE com tratamento secundário de esgoto na Noruega.

Maturama et al. (1992) avaliaram a eficiência do processo de tratamento por lodo ativado em condições de laboratório, na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e as taxas alcançadas foram de 80,0 a 84,0 %. Ao inocularem em camundongos, os oocistos que passaram pelo tratamento de lodo ativado, causaram infecção em 91,0 % dos animais inoculados, indicando que a total inativação dos oocistos não ocorre neste tratamento secundário havendo a necessidade de se complementar o tratamento de esgoto, com processos de desinfecção de efluentes.

Comparando, em escala real, o número de oocistos e cistos presentes no esgoto bruto, com as formas detectadas no esgoto tratado, Carraro et al. (2000) encontraram uma remoção de 77,5 % de oocistos e 74,0 % para cistos ao avaliarem uma ETE com tratamento por lodo ativado. Usando corantes fluorogênicos vitais, os autores observaram as estruturas internas em 49,5 % dos oocistos e 45,5 % dos cistos, presentes em amostras do esgoto tratado. Quando avaliada as amostras do esgoto bruto, a observação das estruturas internas foi possível em um número maior de oocistos e cistos (65,0 e 69,0 %, respectivamente). Estes resultados levaram os pesquisadores a considerar que, embora o processo de tratamento por lodo ativado tenha limitações, como taxas de eficiência de remoção variáveis, ele parece favorecer a excitação, o que indiretamente reduziria o potencial de infectividade das formas parasitárias.

A digestão aeróbia é reconhecidamente mais eficiente na remoção de patógenos do que a digestão anaeróbia. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. e

cistos de *Giardia* spp. tiveram uma redução de 2,96 log (99,8 %) e 1,40 log (96,2 %) durante processo aeróbio do tratamento de esgoto, e, uma redução de 0,30 log de oocisto e nenhuma para cistos, quando a digestão foi anaeróbia (CHAURET et al., 1999).

Segundo alguns pesquisadores, índices de eficiência variáveis, com o processo de lodo ativado, podem ser explicado pelo fato da biomassa de lodo se comportar como um sistema único, que depende das características do esgoto tratado, da configuração hidráulica implantada na estação de tratamento, da temperatura, da idade do lodo, entre outros fatores (VAZOLLÉR et al., 1989; www.tratamentodeagua.com.br).

A combinação de processos de tratamento é uma tendência atual e tem apresentado melhores resultados de remoção de patógenos. O processo de lodo ativado seguido de coagulação química e filtro de areia foi avaliado quanto à sua capacidade de remover oocistos de *Cryptosporidium* spp. Somente o processo de lodo ativado foi capaz de reduzir em 2 log (99,0 %) o número de oocistos presente no esgoto bruto sendo que, quando combinado com o processo químico, houve a adição de mais 1 log na taxa de remoção (SUWA e SUZUKI, 2001). Quando o mesmo tratamento é seguido por um filtro de areia, à remoção de oocistos de 2 log, soma-se 0,5 log, sendo que a remoção alcança 3 log (99,9 %) quando acrescenta-se a coagulação química ao esgoto bruto (SUWA e SUZUKI, 2003).

Com taxas tão variáveis de eficiência de remoção de oocistos e de cistos, a parte líquida resultante da sedimentação dos flocos (que é o esgoto tratado), contém também uma concentração destes parasitos, que está diretamente ligada à concentração inicial dos patógenos presentes no esgoto bruto. Na literatura, os

registros de concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em esgoto tratado são da ordem de 10^1 até 10^3 /litro, respectivamente (CARRARO et al., 2000) e, nem sempre o esgoto tratado passa por processos de desinfecção antes de ser lançado nos corpos d'água. Assim, a despeito de altas taxas de remoção, os processos de tratamento de esgoto em nível secundário não eliminam o risco da transmissão hídrica destes protozoários.

9. Processos de desinfecção do esgoto tratado

O uso do esgoto após tratamento adequado é visto como uma alternativa para a água, principalmente em países que sofrem com a escassez, mas para este reuso, é necessário garantir a boa qualidade deste esgoto tratado, que será reutilizado. O cloro é rotineiramente usado como desinfetante do esgoto tratado, mas como os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são resistentes a ele, existe uma busca por processos de desinfecção eficientes em inativar os patógenos presentes no esgoto. O ozônio e a luz ultravioleta (UV) estão sendo amplamente pesquisados e são promissores candidatos à desinfecção.

O ozônio é um excelente oxidante e por causar dano à parede celular (CRAIK et al., 2000) é capaz de inativar protozoários com equilibrado custo-benefício e adequada taxa de inativação considerando-se a dose e tempo. Porém, como a exposição necessária para se conseguir a inativação é alta, o que há a geração de subprodutos. Quando utilizado um tempo menor de exposição, reduz a formação dos subprodutos, mas a eficiência na inativação destes protozoários é limitada. Embora alguns dos 10 subprodutos possíveis de formação durante o

processo de ozonização não sejam considerados tóxicos, em particular deve-se destacar o bromato que é uma preocupação, pois apresenta potencial cancerígeno para o ser humano, não é biodegradável e uma vez formado, sua remoção é economicamente inviável (FACILE et al., 2000; von GUNTEN, 2003; HIJNEN et al., 2006). Com estes problemas derivados, a luz UV ganhou mais atenção e é vista como uma alternativa promissora apresentando as vantagens de ser um processo físico, sem nenhum adicional químico, necessitar de um curto período de contato, não gerar subprodutos e, ser eficiente na inativação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre outros agentes patogênicos. Entretanto um dos poucos problemas relacionados ao processo de desinfecção por luz UV é o fato dele não deixar residual assim que o efluente sai do reator (HASSEN et al., 2000).

Quando o DNA ou RNA é exposto à luz UV elétrons penetram e quebram as bases causando danos à estrutura dos ácidos nucleotídicos, impedindo a replicação e a transcrição e, portanto a multiplicação do organismo, sendo que esta ação biocida é mais eficiente quando as lâmpadas emitem as radiações no comprimento de onda de 250 a 270 nm (LINDEN et al., 2001; ZIMMER et al., 2003; HIJNEN et al., 2006).

Avaliações *in vivo* da eficiência da luz UV indicam que doses < de 20 mJ cm² geram inativação de 3 log (99,9 %) a 4 log (99,99 %) de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. (ROSE et al., 2002; HAYES et al., 2003; HIJNEN et al., 2006), porém, a pressão da lâmpada, a variação da irradiação emitida e a qualidade do líquido a ser desinfetado, são considerados

quando do ajuste de uma dose (HASSEN et al. 2000; ZIMMER et al., 2003), objetivando a total eficiência.

Baixas doses de UV e a falta de efeito residual podem causar um dano subletal ao DNA o que traria sérias implicações ao uso da luz UV como desinfetante. Os possíveis mecanismos envolvidos no reparo genético incluiriam a foto reparação (recuperação dos dímeros) e a foto reativação (reparo na excisão do gene ou da base e de enzimas) (ROCHELLE et al., 2004; ROCHELLE et al., 2005), sendo que a possibilidade de reparo é inversamente relacionada com a dose (BELOSEVIC et al., 2001).

Estudos recentes indicam que *C. parvum* e *C. hominis* possuem a maioria dos genes necessários para o reparo, mas, se feita a reativação, ela não permitira recuperar os níveis de infectividade existente antes da exposição, pois algumas proteínas essenciais à replicação são irreversivelmente danificadas. O fenômeno de reparo não foi observado em cistos de *G. duodenalis*, protozoário que se mostra muito sensível a radiação por UV (LINDEN et al., 2002; MORITA et al., 2002; ROCHELLE et al., 2004; ROCHELLE et al., 2005). Porém, é necessário ressaltar que resultados discrepantes sobre a eficiência de inativação da luz UV em relação à *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp são registrados na literatura em função do método de escolha para a avaliação da eficiência do processo de desinfecção. Hoje, apenas os métodos de cultivo celular e infectividade em animal são considerados válidos.

10. Metodologias para avaliação da eficiência de processos de desinfecção na inativação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

A inativação de um agente patogênico pode ser definida como a perda da infectividade que é a habilidade de um organismo de sobreviver, infectar outro organismo e, se reproduzir, no caso dos parasitos obrigatórios (QUINTERO-BETTANCOURT et al., 2002). É esta medida de infectividade que indica o risco de aquisição da enfermidade e a sua implicação em Saúde Pública.

Muitos métodos têm sido utilizados para medir esta infectividade e inferir a eficiência de um processo de desinfecção de água ou esgoto. Entre os métodos *in vitro* estão a coloração com os corantes fluorogênicos vitais e os fluorogênicos SYTO-9 e SYTO 59, os testes de excitação e o cultivo celular e, o método *in vivo* de infectividade em animal.

Métodos como a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*) ou qualquer outro método que tenha como alvo rRNA ou mRNA superestimam a infectividade de oocistos ou cistos uma vez que estes ácidos permanecem estáveis por longos períodos sendo amplificados mesmo após a morte celular (GASSER e O'DONOGHUE, 1999; SUNNOTEL et al., 2006).

Mais recentemente, houve a proposição do uso da FISH para a avaliação da infectividade, baseado na premissa de que organismos dados como não-viáveis pela FISH, apresentam significativos danos estruturais à integridade da parede celular dos protozoários (GRACZYK et al., 2007).

Os corantes fluorogênicos vitais PI (iodeto de propídio) e o DAPI (4'-diamidino-2-phenylindol) amplamente difundidos, são baseados na permeabilidade da membrana, que permite ou não a inclusão dos corantes: o PI é um corante de

exclusão, ou seja, cora apenas células mortas ou muito injuriadas e o DAPI, um corante de inclusão para células com a membrana intacta, porém, estes corantes se ligam ao material nuclear e esta ligação, ocorre mesmo que a célula esteja morta. Com estes métodos, avalia-se apenas a injúria celular, sem indicar, no entanto, a atividade metabólica dos esporozoítos ou trofozoítos e assim, não são uma boa ferramenta para medir a infectividade (GASSER e O'DONOGHUE, 1999). Mesmo quando associado à citometria de fluxo, o DAPI não apresentou correlação com o cultivo celular ou teste de infectividade animal (KATO e BOWMAN, 2002) e, em estudo onde foram aplicados juntos, DAPI e PI subestimaram a eficiência da luz UV e do processo de ozonização quando os resultados foram comparados ao cultivo celular e a infectividade animal (LABATIUK et al., 1991; FREIRE-SANTOS et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2001). Ressalta-se que atualmente, o uso do DAPI restringe na análise ambiental, como um teste confirmatório da morfologia, por favorecer a visualização dos núcleos dos protozoários.

Diferença de fluorescência dificulta a leitura dos corantes SYTO-9 e SYTO59, sendo indicado apenas para uso combinado com citometria de fluxo (NEUMAN et al., 2000b).

Excistação é uma metodologia onde as condições enzimáticas estomacais de um animal vertebrado são simuladas *in vitro* e, por indução química, promove-se a excistação dos esporozoíto/trofozoíto. Assume-se assim, que os oocistos e cistos excistados seriam infectantes e os que não excistaram estavam mortos. Esta afirmação não se mostrou válida, uma vez que oocistos considerados não viáveis por está técnica foram capazes de estabelecer infecções em camundongos

(NEUMANN et al., 2000a). Assim, a excistação indica apenas a capacidade do parasito em completar parte de seu ciclo; experimentos com cistos de *G. muris* expostos a luz UV indicaram infectividade inferior a 10,0 % quando utilizada o teste de infectividade animal enquanto que, com a metodologia de excistação, a infectividade foi superior a 80,0 %. Estes resultados indicam que, embora excistados, o dano ao DNA não permitiu o sucesso na replicação, reprodução e no estabelecimento da infecção nos camundongos, resultado que subestimou a eficiência da luz UV em inativar os cistos de *G. muris* (CRAIK et al., 2000).

Com mais de 10 anos em pesquisas, várias linhagens celulares foram avaliadas para a realização da técnica de cultivo celular: HCT-8, AGS (adenocarcinoma estomacal humano) e Caco-2 (célula de adenocarcinoma do cólon) suportam o crescimento intracelular de *Cryptosporidium* spp. Estas camadas celulares são inoculadas com oocistos ou trofozoítos e após 48 ou 72 horas, os pontos de infecção podem ser observados por coloração específica ou uso da PCR (JOACHIM et al., 2003; CHOI et al., 2004). Embora seja considerada uma técnica fácil e sensível a um pequeno número de oocistos presentes em amostras ambientais as várias linhagens de células apresentam diferentes graus de sensibilidade de infecção ao protozoário, além de não permitir a propagação dos oocistos (NEUMANN et al., 2000; ROCHELLE et al., 2002; GIROUARD et al., 2006).

A técnica de cultivo celular é o único modo de avaliação da infectividade de *C. hominis* (espécie responsável por 70,0 % das infecções de criptosporidiose humana), uma vez que esta espécie não infecta os modelos animais mais utilizados em experimentos de infectividade, como ratos e camundongos e,

apresenta o mesmo nível de infectividade que *C. parvum* no cultivo celular (JOHNSON et al., 2005).

Em relação à *Giardia* spp., como este protozoário não é invasivo, habitando o lúmen intestinal de seu hospedeiro, o cultivo celular não pode ser aplicado para análise da infectividade deste parasito.

O experimento de infectividade animal baseia-se na inoculação de um determinado patógeno em animais de laboratório como ratos, camundongos, gerbil, cobaias e, verificar se o ciclo destes parasitos é reproduzido nestes animais (NEUMANN et al., 2000; NOORDEEN et al., 2002). Porém, variáveis são inerentes à esta técnica, podendo apresentar: *i*) variabilidade biológica entre os isolados, *ii*) variabilidade imunológica (susceptibilidade/ resistência) individual dos animais utilizados, *iii*) diferentes e complexos protocolos entre os laboratórios e, *iv*) a necessidade de acompanhamento da infecção leva à necessidade de um tempo maior para se obter os resultados (CLANCY et al., 2000; ROCHELLE et al., 2002; THOMPSON, 2004). Técnica trabalhosa necessita ainda, no caso de inóculos provenientes de amostras de esgoto, de um eficiente protocolo de sanitização desta amostra.

Embora com estas desvantagens, o teste de infectividade animal é o método que melhor promove uma medida direta na habilidade dos parasitos em causar a infecção, pois permite o completo desenvolvimento dos parasitos. Apresentando correlação com o cultivo celular, estas são as únicas metodologias atualmente válidas para avaliação da eficiência dos variados processos de desinfecção em amostras ambientais.

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos *Giardia* spp. no esgoto recebido por uma Estação de Tratamento de Esgoto da cidade de Campinas e a eficiência desta na remoção destes patógenos.

Objetivos específicos:

- Verificar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. no afluente (esgoto bruto),
- Verificar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. no efluente (esgoto tratado),
- Avaliar a eficiência do processo de tratamento de esgoto, adotado pela Estação, em remover oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. e,
- Avaliar a eficiência do processo de desinfecção por luz ultravioleta em inativar oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

Material e Métodos

1- Caracterização do local de estudo

Com uma área de 7,0 hectares, a Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Samambaia está localizada no Bairro Tamoios, região leste de Campinas, divisa com o município de Valinhos (Fig.1). Foi inaugurada em 3 de julho de 2002, atendendo aproximadamente uma população de 60 mil habitantes de 25 bairros. Possui capacidade construída para uma vazão de 150 litros/s, porém durante todo o período de coleta de dados (segundo semestre de 2003, 2004 e primeiro semestre de 2005), funcionou com vazão de 70 litros/s. Esta estação recebe apenas esgoto doméstico que é tratado em nível secundário pelo processo de lodo ativado. Segue o fluxograma (Fig. 2) e uma breve descrição das etapas que compreendem o processo de tratamento do esgoto da ETE Samambaia:

1) *Estação elevatória de esgoto bruto*: ao entrar na estação elevatória para ser bombeado, o esgoto bruto é gradeado em um cesto removível, com barras separadas com espaçamento de 4 cm para retirada dos sólidos grosseiros.

2) *Gradeamento fino*: o esgoto passa por duas grades (espaçamento de 1 cm entre as barras), sendo uma delas mecanizada com braços rotativos e a outra com limpeza manual, para eliminação dos resíduos finos.

3) *Caixa de areia*: formada por canais retangulares onde o ar é introduzido na caixa através de sopradores. Com o objetivo de remover a areia do esgoto e impedir que passe às etapas de tratamentos subsequentes causando desgastes, a aeração mantém a matéria orgânica em suspensão e a areia acumulada no fundo da caixa.

4) *Lagoa aerada*: o esgoto já gradeado e sem a areia, é lançado na lagoa aerada que constitui o alimento para a biomassa (composta principalmente por bactérias) que se forma na massa líquida e promove a decomposição aeróbica da matéria orgânica. Sobre esta lagoa ficam os aeradores flutuantes que tem a finalidade de introduzir oxigênio na massa líquida e proporcionar a homogeneização do conteúdo da lagoa.

5) *Decantadores secundários*: o efluente gerado na lagoa aerada entra no decantador secundário onde será feita a clarificação do efluente final. É nesta fase que ocorre a separação do lodo floculado (biomassa) do efluente final tratado, que é lançado no córrego Samambaia.

6) *Digestor de lodo*: o lodo excedente retirado da lagoa de aeração é enviado ao digestor, onde ocorre um processo biológico de degradação da matéria orgânica, na presença de oxigênio livre. Assim, o resultado é um lodo mais estável e sem odor.

7) *Desaguamento de lodo*: consiste em aumentar a concentração de sólidos nele contido, por meio da retirada de água e desta forma a redução do volume do lodo. Para isto, o lodo é centrifugado e atinge uma porcentagem de 20,0 % de sólidos secos. O sobrenadante resultante do processo de centrifugação é devolvido para a estação elevatória (1ª etapa do tratamento) para ser novamente tratado. O lodo desaguado, conhecido por lodo condicionado ou biossólido, é retirado mecanicamente e acondicionado em um container com capacidade de 14 m³ de volume, antes do seu destino final.

8) *Estação elevatória de recirculação e descarte do lodo*: esta estação permite o retorno do lodo biológico à primeira lagoa de aeração e o descarte do lodo excedente para o digestor.

Na ETE Samambaia existe duas lagoas de aeração, mas em função do menor volume de esgoto tratado, apenas a segunda lagoa está em funcionamento. Durante o período do estudo, todo o lodo excedente e desidratado era levado para a empresa Opersan de Jundiaí/SP, exposto à luz solar e distribuído para uso na agricultura.

Todo o efluente tratado é lançado no córrego Samambaia que se une ao ribeirão Pinheiros, no município de Valinhos e juntos deságuam no Rio Atibaia. A descarga deste efluente ocorre a 2.000 m a montante do ponto de captação de água, de onde são colhidos 90,0 % da água usada para o abastecimento da cidade de Campinas.

Não existe, em sua rotina, uma etapa de tratamento terciário (desinfecção), porém foi instalado, em fase de experimentação, um reator com 2 lâmpadas de luz ultravioleta (UV), modelo In-Line 250 Sistema de desinfecção UV de Líquidos – Alta Intensidade fabricado pela Germetec UV & IR Technology Ltda®. Nesta etapa, parte do efluente tratado (vazão de 12 litros/s), foi desinfetada passando por este reator, ajustado com uma dose entre 25 a 30 mJ/cm² e um tempo de contato do efluente com o UV de 5 segundos. Embora em fase de experimentação, este processo de desinfecção foi avaliado em escala real.

O restante do efluente (cerca de 58 litros/s) é lançado no corpo receptor, sem qualquer processo de desinfecção.

O tempo de permanência do esgoto, desde sua entrada na ETE até o lançamento do efluente no córrego Samambaia, é de cerca de 50 horas, portanto, as coletas deste estudo foram realizadas em dias diferentes, ou seja, o efluente foi colhido cerca de 50 horas após a coleta do afluente, com a finalidade de se obter uma amostra do efluente correspondente àquela do afluente.



Fig. 1. Foto aérea da ETE Samambaia, Bairro Tamoios, Campinas, SP (Fonte – Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A SANASA).

FLUXOGRAMA ETE SAMAMBAIA

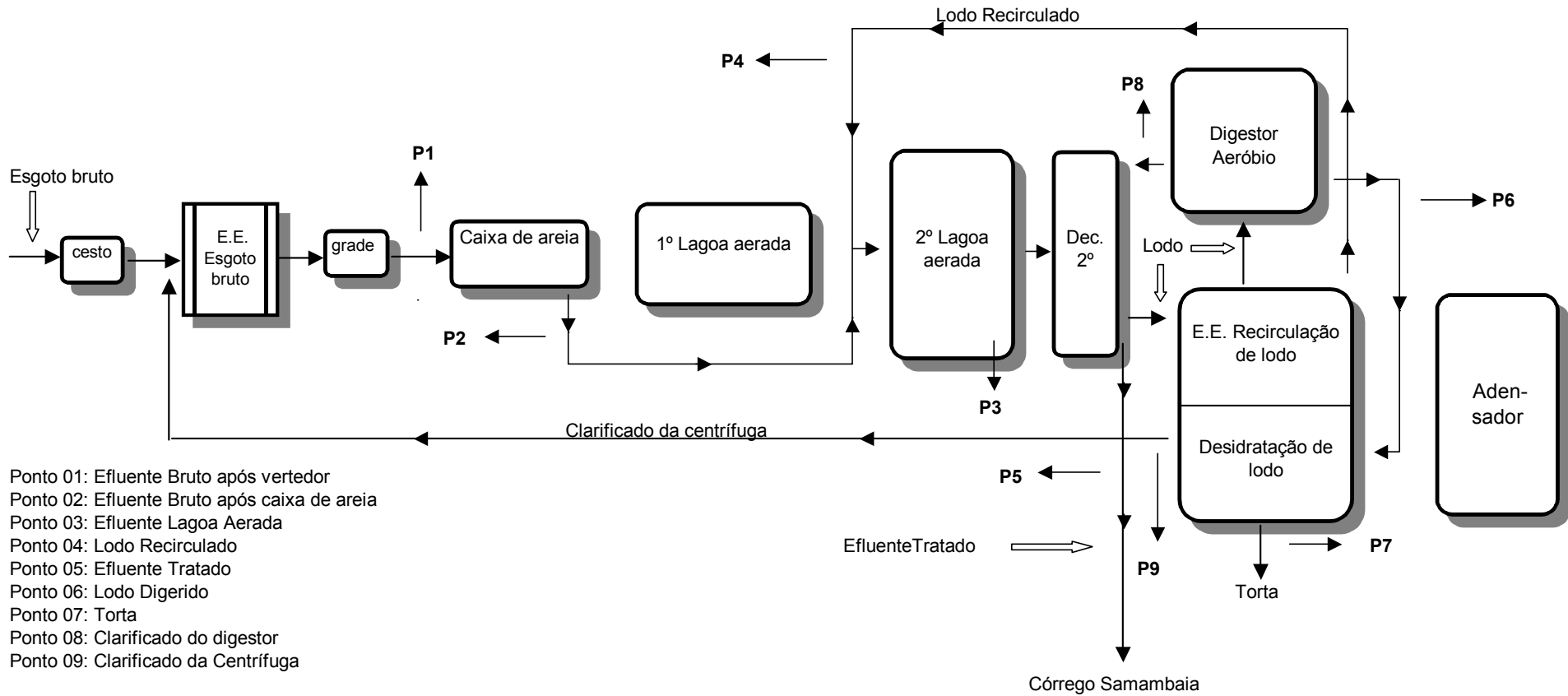


Fig. 2. Fluxograma com as etapas do tratamento de esgoto.

2- Coleta das amostras e metodologias de concentração

Para a avaliação da eficiência do processo de lodo ativado na remoção dos patógenos, foram selecionados três pontos de amostragem na ETE Samambaia, sendo analisados os seguintes tipos de amostra: i) *afluente* (AFL) que constitui o esgoto bruto, ii) *efluente* (EFL) após o tratamento de lodo ativado (nível secundário) e, iii) *efluente desinfetado com UV* (EFL+UV). Todas as amostras foram colhidas em frascos plásticos, previamente descontaminados e lavados com solução de eluição contendo Tween 80 a 0,1 %. Este procedimento foi feito para evitar que os possíveis oocistos e cistos presentes naturalmente nas amostras ficassem aderidos na parede do frasco.

As amostras de afluente foram colhidas superficialmente, no vertedor (Fig. 3), que é a saída do esgoto bruto da caixa de areia. Esta etapa é precedida pelo gradeamento e antecede ao despejo na lagoa de aeração. Tanto a etapa do gradeamento, como a etapa da caixa de areia, fazem parte do processo preliminar do tratamento do esgoto. Um litro do afluente foi colhido com frasco coletor e transferido para o frasco plástico descontaminado.



Figura 3. Caixa de areia com o vertedor.

Dois litros do efluente tratado em nível secundário e aquele desinfetado por UV foram colhidos como descrito a seguir: para o efluente sem desinfecção por UV, o frasco de coleta foi colocado na calha de saída para o corpo d'água receptor e, para o efluente que passava pela desinfecção por UV, o frasco foi colocado no encanamento de saída do reator (Fig.4 a e b).

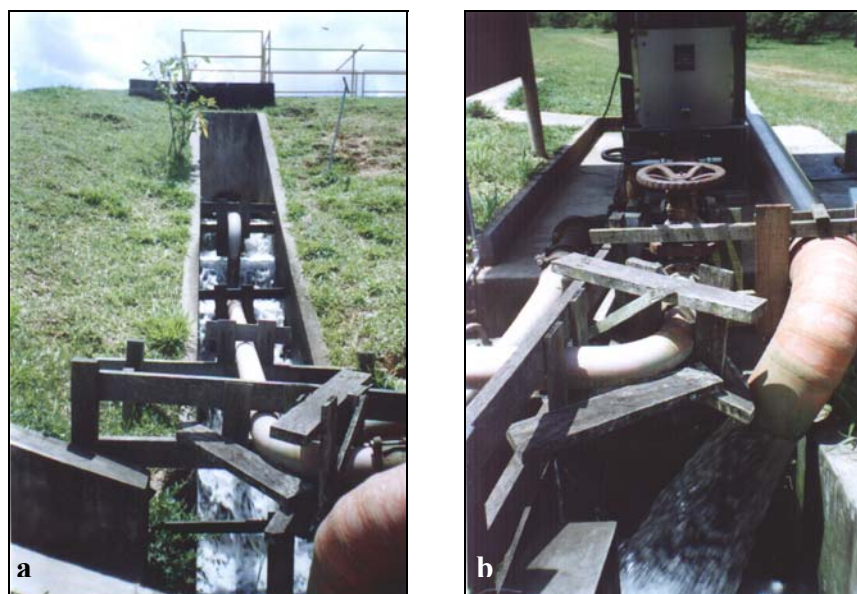


Figura 4. Saída do efluente da ETE Samambaia para o córrego Samambaia. **a:** calha de lançamento do efluente, **b:** calha de lançamento do efluente após desinfecção no reator de luz ultravioleta.

Todas as amostras foram colhidas quinzenalmente durante 2 anos, no horário entre 12:30 e 14:00 horas, período de maior vazão da ETE Samambaia, porém, como o tempo de permanência do esgoto, da entrada na ETE até o lançamento do efluente no córrego Samambaia, é de cerca de 50 horas, as coletas neste trabalho foram realizadas em dias diferentes, ou seja, o efluente foi

colhido 2 dias após a coleta do afluente, com a finalidade de se obter o emparelhamento das amostras.

Após a coleta as amostras foram levadas imediatamente para o Laboratório de Protozoologia do Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, em caixas térmicas a uma temperatura de cerca de 10°C, e processadas no mesmo dia.

2.1. - Técnica de centrífugo-concentração

No laboratório, as amostras do afluente foram concentradas e purificadas de acordo com protocolo modificado de Robertson et al. (2002), como descrito a seguir.

Em tubos de centrífuga de 15 ml, foram colocados 5 ml da amostra previamente filtrada em peneira plástica de 1mm², e completado com 10 ml de solução de eluição (diluição 1:3). A seguir, foram centrifugadas a 1.500 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento final (com um volume de 1,0 ml) transferido para tubos de microcentrifugação e mantido sob refrigeração à 4°C.

2.2. - Técnica de filtração em membrana

Para a análise do efluente desinfetado ou não com UV, as amostras foram concentradas de acordo com protocolo modificado de Franco et al. (2001), como descrito a seguir.

As amostras foram filtradas em membranas de ésteres mistos de celulose, com 47 mm de diâmetro e porosidade nominal de 3 µm (marca Millipore®), através de um sistema de filtração com bomba e porta filtro da marca Gelman®.

Em cada amostra de efluente um volume mínimo de 1.200 ml e máximo de 2.000 ml dependendo da turbidez, foi filtrado com fluxo de 1 a 4 litros/ minutos. Após a filtração, as diversas membranas foram cuidadosamente retiradas e colocadas em placas plásticas estéreis para realizar a etapa de recuperação de cistos e oocistos eventualmente presentes nas amostras. Para tanto, a superfície das membranas foi raspada por 10 minutos com alça plástica macia seguida de lavagens manuais (por 10 minutos) com solução de eluição (Tween 80, 0,1%). Estas lavagens foram feitas alternadamente e o líquido resultante transferido para tubos cônicos e concentrado por centrifugação (1.050 x g; 10 minutos). O sobrenadante foi aspirado e o sedimento resultante lavado em água destilada e novamente submetido à centrifugação, nas mesmas condições.

Após o descarte do sobrenadante, o sedimento desta segunda centrifugação, foi completado até o volume de 1 ml, transferido para tubos de microcentrifugação e mantidos sob refrigeração a 4° C .

Os diversos sedimentos (do afluente e do efluente) foram posteriormente avaliados empregando o teste de reação de imunofluorescência direta (RID).

3- Visualização e enumeração por reação de imunofluorescência direta (RID) e teste confirmatório da morfologia dos protozoários com corante vital DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol)

Com a finalidade de retirar alíquotas dos sedimentos para a realização da RID, as diversas amostras foram submetidas ao protocolo de homogeneização segundo Redlinger et al. (2002), conforme segue.

O tubo contendo a amostra concentrada foi agitado em vórtex Phoenix® AP-56, por 2 minutos e a seguir invertido 3 vezes com o propósito de tornar a distribuição de cistos e oocistos eventualmente presentes homogênea, sendo feita imediatamente a transferência de cada alíquota para o poço da lâmina de RID.

Para as duas metodologias, uma ou mais alíquotas de 5 µl do sedimento final foram cuidadosamente espalhadas nos poços das lâminas para realização da RID. Após secagem em temperatura ambiente, as mesmas foram fixadas com 10 µl (10 minutos) de metanol. A seguir, acrescentou-se uma gota do reagente contendo os anticorpos monoclonais sendo as diversas preparações mantidas por 30 minutos em câmara úmida e protegidas da luz.

Foi realizada uma lavagem utilizando-se a solução tampão fosfato (pH 7,5) presente no kit Merifluor® diluída (1:20) para retirar o excesso de anticorpo. Este procedimento foi realizado com a lâmina inclinada em 45° e, sem tocar o poço contendo as amostras. A remoção do excesso da solução tampão, foi realizada com papel absorvente. Em seguida, o corante vital DAPI foi aplicado na diluição de 1:2500 e mantido sobre proteção da luz por 10 minutos.

Após este período, foram realizadas 2 lavagens com 10 µl de solução tampão fosfato (pH 7,5) de 1 minuto cada, seguida de uma lavagem com água destilada (10 µl/1 minuto), sempre protegida da luz.

Após estas lavagens, as lâminas ficaram em dessecador e protegidas da luz por 1 hora e, depois deste período, receberam uma gota de meio de montagem e foram cobertas com lamínula.

O microscópio de epifluorescência para a visualização da RID possui filtro de excitação 450 a 490 nm e filtro de barreira de 520 nm e para visualização do DAPI filtro de excitação 365 a 400 nm e um filtro de barreira de 395 nm.

O kit para reação de imunofluorescência direta utilizado neste trabalho foi o de marca comercial Merifluor® (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio), e o corante vital DAPI da Sigma Chemical®, ambos validados pela Environmental Protection Agency (EPA), dos Estados Unidos da América.

Os critérios de positividade considerados para as amostra foram: o tamanho e o formato similares aos cistos (8 a 14 µm) e oocistos (4 a 6 µm) presentes na amostra controle, o grau de fluorescência verde-maçã brilhante predominante na parede e mais fraca quando comparada com a fluorescência da parede dos cistos e oocistos, fluorescência sem difusão quando focada no microscópio e, visualização de caracteres morfológicos como axonemas, corpos medianos e núcleos para cistos e, número e presença de esporozoítos e sutura nos oocistos. Para ambos os organismos, foram observados a ausência de poros ou deformidades nas extremidades.

O corante de inclusão DAPI, utilizado como um teste confirmatório morfológico dos organismos encontrados, quando positivo para *Cryptosporidium* spp., os oocistos que o incluem, são observados, no microscópio, apresentando coloração azul-céu intensa e visualização de 1 a 4 núcleos também azuis dentro de 1 único oocisto. Nos cistos de *Giardia* spp., observa-se a coloração cor azul-céu nos núcleos.

Após a enumeração dos eventuais cistos e oocistos presentes nas amostras, o cálculo da estimativa do número de cistos e oocistos /L para cada amostra foi feito com base na fórmula:

$$X = \frac{n}{k} \times \frac{S}{A} \quad (a)$$

sendo:

X = concentração de oocistos ou cistos /L

n = número de oocistos ou cistos visualizados na lâmina

k = 5 (vol. de sedimento examinado = 5 µl)

S = volume do sedimento obtido (µl)

A = volume filtrado da amostra (L)

Após a realização da RID, os tubos com as amostras foram centrifugados por 10 minutos a 1.050 x g , o sobrenadante descartado e ao sedimento resultante, acrescentado solução de dicromato de potássio a 2,0 % até o volume de 1 ml e mantidas sob refrigeração de 4°C. A adição do dicromato de potássio foi feita

visando a conservação das amostras e manutenção da infectividade dos cistos e oocistos presentes com a finalidade de possibilitar futuramente a realização do experimento de infectividade animal (item 5).

4- Experimentos-controle da metodologia de detecção

4.1- Experimentos controle-negativos.

Os experimentos controle-negativo foram realizados para detectar possíveis contaminações durante o protocolo de filtração em membrana. Para isto, 2 litros de água destilada foram filtrados empregando-se o mesmo procedimento usado para as amostras de efluente como descrito no item 2.2. Este experimento controle foi realizado imediatamente após o experimento controle-positivo, descrito abaixo.

4.2. - Experimentos controle-positivos.

Um experimento controle-positivo foi realizado a cada 20 amostras naturais processadas, para avaliar a sensibilidade de recuperação de cistos e oocistos das duas metodologias utilizadas. Cinco mililitros de afluente e 2.000 ml de efluente foram contaminados artificialmente com uma suspensão contendo um número conhecido de cistos e oocistos e, processados com as metodologias de centrífugo-concentração (item 2.1) e filtração em membrana (item 2.2), respectivamente.

Para a contaminação artificial das amostras controle, com o propósito de estipular a dosagem a ser utilizada no experimento-controle, utilizou-se a suspensão “controle positivo” que acompanha o kit Merifluor®. Para isso, efetuou-

se a enumeração de organismos presentes na suspensão, através de contagem realizada em lâmina de imunofluorescência, obtendo-se desta forma, o número de cistos e oocistos em 5 µl presentes em 3 poços da lâmina, respectivamente.

A leitura destas 3 alíquotas foi feita por 3 microscopistas distintos e sem o conhecimento prévio do resultado de cada contagem, obtendo-se a seguir, o valor médio do número de formas presentes na preparação. Quando necessário e com base no valor médio de cistos e oocistos encontrado ($> 10^2$ formas/5 µl), a suspensão inicial foi diluída em solução tampão, sendo feita uma nova enumeração.

Utilizou-se como inóculo a dosagem média de $3,44 \times 10^3$ oocistos e $4,20 \times 10^2$ cistos, em cada experimento-controle realizado.

Cinco mililitros de afluente e 2.000 ml de efluente (amostras naturais) eram concomitantemente analisados, para se verificar a presença intrínseca destes organismos nestas amostras. Em caso de positividade e considerando o cálculo da eficiência de recuperação (fórmula *b*), o número de cistos e oocistos encontrados nas amostras naturais era subtraído do valor referente às formas de resistência visualizadas e enumeradas nos poços das lâminas durante o processamento das amostras inoculadas artificialmente.

Em ambos os casos, experimento-controle positivo (com afluente e efluente contaminados artificialmente) e experimento-controle negativo (somente água destilada), alíquotas de 5 µl do sedimento resultante do processamento, foram examinadas através de RID Após enumeração dos organismos na lâmina de RID,

o cálculo da eficiência de recuperação das metodologias foi realizado com a fórmula:

$$Y = \frac{r}{i} \times 100 \quad (b)$$

sendo,

Y = eficiência de recuperação

r = número de cistos e oocistos recuperados

i = número de cistos e oocistos inoculados

5- Experimento de infectividade animal

Com o objetivo de conhecer a eficiência do reator de luz UV, instalado na ETE Samambaia, em inativar cistos de *Giardia* spp. no esgoto tratado, realizou-se um experimento de infectividade animal. Como oocistos de *Cryptosporidium* spp foram detectados apenas em uma amostra de efluente e cistos de *Giardia* spp foram frequentemente encontrados optou-se por realizar o experimento de infectividade animal apenas para cistos de *Giardia* spp. Para tanto o delineamento deste experimento foi constituído das seguintes etapas:

1. Sanitização das amostras de efluente (tratado ou não pela luz UV).
2. Inoculação intragástrica das amostras de efluentes, em camundongos linhagem BALB/c nude, mantidos em isolador, de acordo com os grupos tratamento.
3. Observação diária dos animais para verificar a presença de sinais clínicos.
4. Coleta diária das fezes, a partir do 5º dia, até o 15º dia após inoculação.
5. Concentração das fezes dos animais em solução de sulfato de zinco, para a pesquisa de cistos.
6. Necrópsia dos animais e análise macroscópica e microscópica dos intestinos:
 - 6.1. Histologia do duodeno.
 - 6.2. Confeção das preparações por aposição dos segmentos intestinais e coloração por Giemsa.
 - 6.3. Exame a fresco do raspado da mucosa dos segmentos intestinais para a pesquisa de trofozoítos e, mediante coloração por Giemsa.
7. Análise e interpretação dos resultados. *

*O encontro de cistos ou trofozoítos em alguma destas análises, foi interpretado como evidencia direta do estabelecimento de uma infecção.

5.1. - Grupos de tratamento

Os animais utilizados no experimento de infectividade foram divididos em 4 grupos distintos, de acordo com a amostra inoculada:

- Efluente sem desinfecção por luz UV (EFL).
- Efluente desinfetado por luz UV (EFL+UV).
- Efluente livre de cistos de *Giardia* spp. (EFLF)
- Sentinela (ST).

5.2. - Critérios de escolha das amostras de efluente utilizadas no experimento de infectividade animal.

Das amostras de efluente examinadas no período de maio a junho de 2004, e que foram positivas para cistos de *Giardia* spp. (cerca de 7 cistos/em cada alíquota de 5 µl), 5 foram sorteadas para o experimento de infectividade.

Outras 5 amostras de efluente, anteriormente processadas mediante a técnica de filtração em membrana (item 2.2) foram também selecionadas e constituíram o grupo controle-negativo com a finalidade de atestar a eficiência do protocolo de sanitização das amostras. Para tanto, essas amostras foram novamente submetidas à filtração em membrana (item 2.2) com o propósito de tornar o filtrado deste processo, livre de cistos de *Giardia* spp., sendo designada como EFLF (efluente filtrado).

Previamente à inoculação dos animais, as diversas amostras dos diferentes grupos de tratamento foram sanitizadas, visando a eliminação de outros agentes patogênicos eventualmente presentes no efluente da ETE Samambaia.

5.3. - Sanitização da amostra de efluente, positivo para cistos de *Giardia* spp.

As diferentes amostras, mantidas em solução de dicromato de potássio 2,0 % foram centrifugadas a 1.500 x g por 15 minutos, para promover a retirada do fixador. Após descarte do sobrenadante, o volume de 1 ml foi completado com solução tampão fosfato estéril ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7.2), o sedimento ressuspenso no vórtex e novamente centrifugado na mesma velocidade e tempo. Após uma segunda lavagem, as amostras foram homogeneizadas e unidas em tubos de centrifuga de 15 ml de volume total. Procedeu-se a nova centrifugação nas mesmas condições, retirou-se o sobrenadante e acrescentando solução tampão fosfato salino estéril na diluição de 1:1.

A seguir adicionou-se o hipoclorito de sódio 1,0 % (1:1) e após homogeneização no vórtex os tubos foram refrigerados 4° C por 60 minutos, com a finalidade de não permitir o desencistamento. Na seqüência, os tubos foram centrifugados a 1.500 x g por 15 minutos, o sobrenadante descartado e realizadas 3 lavagens sucessivas com solução tampão fosfato salino estéril para retirada dos resíduos da solução de hipoclorito de sódio.

Finalmente, procedeu-se a última lavagem e ao sedimento resultante, adicionou-se solução tampão fosfato salino estéril (1:1) sendo os tubos mantidos sob refrigeração (4° C) por 48 horas, até a inoculação nos animais.

5.4. - Inoculação das amostras e manutenção dos animais

Os camundongos foram colocados em caixas, individualizados por grupo, em isolador de primeiro uso, um dia antes da inoculação para adaptação (PASSOS e ALVES, 1996).

Todo o experimento foi realizado no isolador asséptico, assim, a maravalha, a ração e a água mantidas dentro do isolador foram fornecidas pelo CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica), autoclavadas.

Dentro do isolador, cada animal (com exceção do animal sentinela) foi inoculado intragástricamente com 10 µl de cada amostra (EFL, EFL+UV e EFLF).

Camundongos fêmeas da linhagem BABL/c nude com idade variando entre 3 e 4 semanas, foram obtidos do CEMIB desta Universidade, sendo os animais distribuídos em 4 grupos de tratamento distintos de acordo com a amostra inoculada:

- a) EFL: n = 3;
- b) EFL+UV: n = 3;
- c) EFLF: n = 2;
- d) ST: n = 1.

Foram inoculados 10 µl de amostra em cada animal, o que resultou na dose de 17,2 cistos (EFL+UV) e 11,6 cistos (EFL). Estas dosagens foram estimadas com base no número observado, previamente, em 5 µl de amostra, obtidos durante a leitura da lâmina de RID (item 3).

As fezes dos animais coletadas foram colocadas em tubos de microcentrifugação e conservadas em dicromato de potássio 2,0 % para serem concentradas posteriormente e observada a eliminação ou não, de cistos.

Todo o material utilizado para a coleta diária das fezes (tubos, frasco com dicromato de potássio, pipetas Pasteur, tesoura, canetas, etc.), foi previamente desinfetado com ácido peracético diluído em água (1:2) por 30 minutos, no porto de passagem do isolador. Ao final do experimento de infectividade, todo o isolador foi desinfetado com ácido peracético (1:1) por 30 minutos. O animal sentinela, introduzido junto com os animais tratados, foi utilizado como parâmetro para a ausência de possíveis patógenos dentro do isolador.

O protocolo deste experimento de infectividade foi submetido para a Comissão de Ética em Experimentação Animal / CEEA-IB-UNICAMP (protocolo 909-1), e aprovado por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA).

5.5. - Necrópsia e análise macroscópica e microscópica dos intestinos

No décimo quinto dia após a inoculação, todos os animais foram mortos por deslocamento cervical.

O intestino delgado (duodeno e íleo) de cada camundongo foi removido e colocado em placa de Petri com solução de PBS e mantidos em estufa a 37° C. O primeiro centímetro do duodeno foi cortado e fixado em conservante de Raillet-Henry para a confecção dos cortes histológicos.

Individualmente, o restante do intestino de cada animal, era retirado da estufa e analisado pelas seguintes técnicas:

1) após corte longitudinal, o intestino foi invertido e suavemente passado em papel de filtro para retirada do excesso de fezes. Em seguida, efetuaram-se preparações por aposição, em lâminas limpas e secagem à temperatura ambiente. Após fixação com metanol por 5 minutos, as lâminas foram coradas com Giemsa (1:10) por 30 minutos, lavados em água corrente e deixados à temperatura ambiente para secar. A preparação foi recoberta com lamínula tendo-se adicionado uma gota do meio de montagem Cytoseal®, para posterior análise. Foram confeccionadas 2 lâminas para cada animal.

2) raspado e lavado com solução tampão fosfato salina estéril e transferido para lâmina, sendo observado a fresco ou ainda, corado com Giemsa (1:10). Em ambas as preparações, objetivou-se a pesquisa de trofozoítos.

3) cortado em pequenos pedaços e com solução tampão fosfato salino estéril levado ao vórtex por 3 minutos, transferido para uma lâmina limpa, corado com Giemsa (1:10) e observado na procura de trofozoítos.

5.6. - Concentração das fezes

As fezes dos diversos animais foram analisadas para se verificar a presença de cistos, utilizando a metodologia de flutuação em sulfato de zinco, segundo protocolo de Faust et al. (1939), descrito abaixo.

Os tubos contendo as fezes foram centrifugados a $1.500 \times g$ por 5 minutos para retirada da solução de dicromato de potássio. Após lavagem com água

destilada, a amostra de fezes foi transferida para tubos de centrifuga, acrescida de água destilada. Após 3 lavagens (650 x *g* por 5 minutos), foram adicionados 3 ml de solução de sulfato de zinco ($d = 1,2$), centrifugado a 145 x *g* por 3 minutos. Após transferência da amostra para uma lâmina e coloração com Lugol foi feita avaliação para a busca de cistos.

5.7. - Cortes histológicos: preparação das peças

Após remoção da solução de Raillet-Henry, o duodeno dos animais foi submetido à lavagem em água corrente por 30 minutos. Depois, foram colocados em desidratação seriada com álcool 70,0, 80,0 e 90,0 %, respectivamente, por 15 minutos e, em álcool absoluto por 30 minutos, fazendo por 3 vezes a troca de álcool ao final de cada período. Finalmente, as preparações foram submersas em álcool e xilol na proporção de 1:1, por 15 minutos, sendo em seguida realizado 2 banhos em xilol por 15 minutos.

Após desidratação, as peças foram impregnadas em solução de xilol e parafina (1:1), por 30 minutos e a seguir, submersas em parafina líquida e acondicionadas em estufa a 56° C por 24 horas, para posterior realização dos cortes histológicos.

5.8. - Cortes histológicos: corte das peças e coloração das lâminas

Os blocos de parafina contendo o duodeno dos animais foram cortados em micrótomo com 5 µm de espessura e, em seguida, colocados sobre as lâminas; tendo-se adicionado uma gota de álcool 70,0 % e levados ao banho-maria por 1

minuto sendo em seguida transferidos para lâminas forradas com albumina glicerizada e levadas à estufa a 37° C.

Após secagem, procedeu-se a desparafinização dos cortes (com banhos em xilol e álcool absoluto) e, a coloração por hematoxilina de Ehrlich, diferenciados com ácido clorídrico e corados com eosina. Depois de lavagens com álcool e xilol, a lâmina foi então montada com uma gota do meio de montagem Cytoseal®.

6- Análise dos dados

A eficiência do processo de lodo ativado em remover oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp foi considerada em função da fórmula:

$$ER = n - k \quad (c)$$

onde:

ER = eficiência de remoção

n = número de oocistos e cistos observados no afluente

k = número de oocistos e cistos observados no efluente

O Teste *t* de Student foi utilizado para a comparação do número médio de oocistos e cistos encontrados nas amostras de afluente e efluente e, nas amostras de efluente (EFL) e efluente desinfetado por UV (EFL+UV), assim como para

análise dos resultados do experimento de infectividade animal. Para isto, utilizou-se o programa BioEstat® versão 2.0.

Resultados

Os resultados são apresentados em dois capítulos, como segue:

- **Capítulo 1:** Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* spp cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at sludge treatment plant in Campinas, south east of Brazil. (artigo publicado no periódico **Water Sci. Technol.** **54** (3): 89-94, 2006).
- **Capítulo 2:** Infectividade de *Giardia* spp. em camundongos BALB/c nude, inoculados com cistos obtidos de efluente de esgoto desinfetado por luz UV (artigo submetido ao J. **Water and Health**).

Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil

R. Cantusio Neto^{***}, J.U. Santos^{*} and R.M.B. Franco^{*}

^{*}Laboratory of Protozoology, Dept of Parasitology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^{**}Laboratory of Microbiology, Society for Water Supply and Sanitation (SANASA), Campinas, São Paulo, Brazil (E-mail: microbiologia@sanasa.com.br)

Abstract Among many waterborne diseases the giardiasis and cryptosporidiosis are of particular public health interest, because *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts can persist for long periods in the environment, and both pathogenic protozoa have been implicated as the cause of many outbreaks of gastroenteritis in the last 25 years. In order to evaluate the efficiency of cysts and oocysts' removal by the activated sludge process, and by UV reactor in inactivating cysts and oocysts in one wastewater treatment plant (WWTP) of Campinas, three sampling points were selected for study: (1) influent, (2) treated effluent without UV disinfection and (3) treated effluent with UV disinfection. *Giardia* spp. cysts prevailed with higher density in the three different sample types. *Cryptosporidium* spp. oocysts were observed in only two samples of influent and just one sample of treated sewage with UV disinfection. In the animal infectivity assay for *Giardia* spp, one mouse of the UV treated group revealed trophozoites in intestinal scrapings. The results of the present study indicate that treatment by activated sludge process delivered a reduction of 98.9% of cysts and 99.7% of oocysts and UV disinfection was not completely efficient regarding the inactivation of *Giardia* cysts in the case of the WWTP studied.

Keywords Brazil; cysts; infectivity; oocysts; UV; wastewater

Introduction

Currently, water quality is of great concern in several countries worldwide due to its scarcity and the possibility of contamination by a wide range of pathogenic organisms (viruses, bacteria or protozoa) that may pose a health hazard to the human population (Craun and Via, 1998). During 1971–1994, 740 waterborne outbreaks occurred in the United States; protozoa were the most frequently identified cause of these outbreaks (20%) and illness (78%). In this respect, giardiasis is today the most frequently diagnosed waterborne disease (Thompson, 2004) and along with *Cryptosporidium* is the major public health concern in water utilities in developed and developing nations.

In Brazil, the census of IBGE (IBGE, 2000) noted that only 20% of municipalities collect and treat sewage before discharging it into the environment, which is a major source of parasites.

Materials and methods

The Samambaia wastewater treatment plant (WWTP) uses a conventional sewage treatment system based on screening, aeration and biological oxidation through activated sludge, secondary clarification and disinfection of the secondary effluent with a dose of 25–30 mJ/cm² (medium-pressure UV) and an outflow of 7 L/sec.

In order to evaluate the efficiency of cysts and oocysts' removal by the activated sludge process, three sampling points were selected: (1) influent, (2) treated effluent without UV

disinfection and (3) treated effluent with UV disinfection. During two years, samples (influent: $n = 53$; treated effluent without UV disinfection: $n = 53$; treated effluent with UV disinfection: $n = 38$) were collected once in two weeks.

Efficiency of activated sludge in removing cysts and oocysts

To evaluate the removal efficiency of the activated sludge process the difference between the number of cysts and oocysts present in the influent and in the effluent samples was considered. Consequently, a parasitological analysis of the influent samples was performed in accordance with Robertson *et al.* (2000), with minor modifications. After centrifugation ($1,500 \times g$; 15 min) the supernatant was discharged and the resultant pellet was analysed for the presence of cysts and oocysts. Effluent samples (1,200–2,000 mL, following disinfection with UV or not) were examined after cellulose esters membrane filtration (porosity of $3 \mu\text{m}$; diameter of 47 mm – Millipore®). Each membrane was submitted to sample elution by alternately scraping the membrane with a smooth-edged plastic loop and rinsing with elution solution. The obtained solution was centrifuged at $1,050 \times g$ for 10 min and the concentrated pellet was washed and centrifuged again (Franco *et al.*, 2001). The density of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in both samples was determined by fluorescent monoclonal antibody tests (IFA) (kit Merifluor® – Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. The samples were then kept in 2% potassium dichromate solution. Positive and negative control trials were performed to evaluate methodology sensitivity and any contamination of the equipment used. *Giardia* and *Cryptosporidium* suspensions provided in the Merifluor kit as positive staining controls were pooled for use in control spiking. For this purpose, the estimated number of oocysts/cysts was calculated by the following formula:

$$x = [\text{No. of (oo)cysts} \times 10^6] / [\text{vol. of sample in well}] \\ \times [\text{vol. of pellet (1 mL)}] / [\text{vol. of sample (mL)}]$$

Animal infectivity assay

Since oocysts of *Cryptosporidium* spp. were detected in only one effluent sample, we chose to evaluate the infectivity of *Giardia* spp. cysts. Groups of 3–4-week-old female BABL/c nude immunodeficient mice (lineage Pasteur) were purchased from CEMIB (Multidisciplinary Centre for Biological Investigation – UNICAMP), which ensured that mice were free from all possible protozoan infections. The animals were allocated four treatment groups in accordance with the inoculum: (1) treated effluent with UV disinfection ($n = 3$); (2) treated effluent without UV disinfection ($n = 3$); (3) effluent treated and filtered in cellulose esters membrane (porosity $3 \mu\text{m}$) and thus presumably *Giardia* spp. cysts-free ($n = 2$); (4) sentinel animal – not inoculated ($n = 1$). In order to prevent undesirable microbial infection of these animals, previously to inoculation all samples were sanitised with sodium hypochlorite at 1% (60 min; 4°C) and the bleach was washed out. Each mouse (with the exception of the sentinel) was inoculated via intragastric with a mean dosage of 14 cysts/10 μL . The number of cysts in samples was determined by IFA. Mice were kept in isolation in new cages. From day 5–15 p.i., all animals had their faeces collected in 2% potassium dichromate solution. These faeces were assayed by zinc flotation (specific gravity = 1.2) for the presence of cysts. On day 15 p.i. all animals were anaesthetised and necropsied. The small intestine of each mouse was removed and placed in a Petri dish containing PBS solution. The mucosal scrapings of upper duodenum and ileum were stained by Giemsa for the presence of trophozoites. Wet mounts

of intestinal contents were also examined for trophozoites. Mice were recorded as *Giardia*-infected if cysts or trophozoites were found in faecal specimens and positive Giemsa staining of intestinal scrapings, respectively.

Statistical analysis

Student's *t*-test with a *p*-value <0.005 was used to analyse the data.

Results and discussion

With regards to the efficiency of recovery rates of cysts and oocysts (Table 1) achievable by the different methodologies used in this study, the recovery above 100% for *Giardia* cysts was attributed to a great inherent variation associated with the preparation by dilution of the cysts and oocysts seeded suspension (Lindquist *et al.*, 1999). The result of the control trial designed for evaluating any contamination in the equipment used for membrane filtration was negative.

Giardia spp. cysts were found in 90.5% of the influent samples (mean: 1.0×10^5 cysts/L $\pm$ 8.7), in 96.2% of effluent not treated by UV-light samples (mean: 1.1×10^3 cysts/L $\pm$ 1.0) and in 94.7% of UV-treated effluent samples (mean: 1.1×10^3 cysts/L $\pm$ 1.0). *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in only 6.4% of the raw wastewater samples (mean: 6.0×10^4 oocysts/L $\pm$ 2.8) and in one sample of UV-treated effluent (1.6×10^2 oocysts/L). Although both parasites were found in this study, *Giardia* spp. prevailed in all samples with higher density than *Cryptosporidium* (Figure 1). Our results are similar to those of Briancesco and Bonadonna (2005), who also found variable protozoa concentration in wastewater samples.

Many factors are involved in the environmental ecology of cryptosporidiosis and the climate is considered to be one of the main ones; this infection exhibits a distinct seasonality in Brazil associated with the rainy season (Rose *et al.*, 2002). Besides, the occurrence of *Cryptosporidium* in surface natural waters is low in this country (Franco *et al.*, 2001; Hachich *et al.*, 2004). Further, there are some difficulties related to the detection of these protozoa in sewage samples because of their rich variety of microorganisms, their complex organic and inorganic composition, and additionally, the lack of a standard methodology for concentration of cysts and oocysts in wastewater samples. It should be noted that cryptosporidial oocysts exhibit a great tendency to adhere to particulate matter (Medema *et al.*, 1998), usually present in these samples, which also would explain the low percentage of positive samples for *Cryptosporidium* in this study.

When evaluating two procedures for detecting *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage samples (ether clarification vs. saturated sucrose flotation), Santos *et al.* (2004) found a significant difference (*p* = 0.05) between the two protocols in respect to the recovery of *Giardia* spp. cysts in favour of the ether clarification; the same did not occur for *Cryptosporidium* oocysts.

Enumerations of *Giardia* spp. cysts in the influent and the effluent samples indicated that in this study the activated sludge treatment reached a removal rate of 98.9% for the cysts initially present in raw sewage, while for *Cryptosporidium* spp. oocysts the removal

Table 1 The efficiency of recovery of cysts and oocysts by the different methodologies used in this study

Microorganism	Methodologies	
	Membrane filtration	Centrifugal concentration
<i>Giardia</i> spp.	58.8%	124.0%
<i>Cryptosporidium</i> spp.	26.6%	65.8%

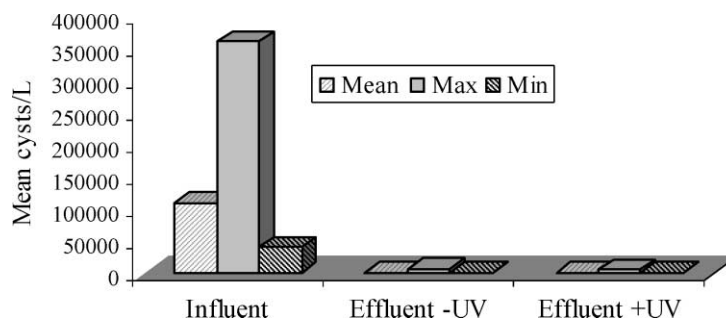


Figure 1 Average cysts of *Giardia* spp. recovered for wastewater samples in wastewater treatment plant in Brazil, during two years

rate was 99.7% (Figure 1). Considering both protozoa, the treatment's effect was statistically significant ($P < 0.005$) between the Samambaia WWTP influent and effluent samples (without being statistically significant ($P < 0.005$) between samples of effluent UV treated or not). Data extracted from the literature show that the efficiency of activated sludge in removal of these protozoa is variable: Payment *et al.* (2001) registered a rate of *Giardia* cysts removal of 74.0% and Maturama *et al.* (1992) reported a *Cryptosporidium* oocysts removal efficiency of 84.0%.

Despite a high removal rate attained in this study (98.9%), a portion of the *Giardia* spp. cysts reached the environment by means of discharge of WWTP Samambaia-treated effluent into the Pinheiros streams and from this to the Atibaia river. For this reason, it was the purpose of this study to assess whether cysts exposed to treatment with UV radiation would be capable of retaining their infectivity, given the risks to public health. Thus, we chose to perform an animal infectivity assay because it is now well established that vital dyes (such as 4,6-diamidino-2-phenylindole and propidium iodide) or *in vitro* excystation cannot be relied upon to estimate cyst infectivity accurately post-UV treatment; thus the former test using a suitable host model should be considered as the best method to determine inactivation levels (Betancourt and Rose, 2004).

In this study, intragastric inoculation of *Giardia* cysts (recovered from effluent treated or not by UV light) in mice resulted in the release of cysts in the faeces of six animals, detected on days 5–15 p.i. corresponding to the post-inoculation period where other researchers have identified a peak cyst excretion (Garcia *et al.*, 2002). The cyst counts were variable (data not shown). One mouse inoculated with effluent treated by UV radiation that shed cysts in the faeces also had trophozoites observed in intestinal scraping specimens; this fact was interpreted as direct evidence of the establishment of a patent infection. The animals of effluent treated and filtered group and of the sentinel group did not present infection (Table 2).

Ultraviolet radiation has been widely used in the USA as a microorganism reduction technology for wastewater effluent, mainly for reduction of faecal coliform bacteria

Table 2 Presence of cysts in faeces and trophozoites in intestinal scrapings of mouse infectivity for determining *Giardia* spp. cysts' inactivation by UV light

Groups	Presence of cysts	Presence of trophozoites
Effluent + UV ^a	+ ^c (3/3)	+ (1/3)
Effluent - UV ^b	+ (3/3)	- (0/3)
Effluent filtrated (control group)	- ^d (0/3)	- (0/3)
Sentinel	- (0/3)	- (0/3)

Note: ^a = effluent treated by UV. ^b = effluent not treated by UV. ^c = positive. ^d = negative

(Belosevic *et al.*, 2001). Little is known about inactivation of *Giardia* spp. cysts by UV disinfection in wastewater. Jolis *et al.* (2001) observed that coliform inactivation rates decreased with the increase of particles greater than 7 μm in suspension in the secondary effluent.

When evaluating the influence of wastewater quality on the UV disinfection performance, in effluent samples presenting suspended solids (around 5–36 mg/L) and turbidity (around 2–44 NTU) the necessary dose for disinfecting this sample was 160 mJ/cm², 10 times higher than that needed for high-quality effluent samples (<2–3 mg/L and 0.7–1.2 NTU) (Savoie *et al.*, 2001).

Amoah *et al.* (2005) found that the addition of particulate matter was correlated with a statistically significant reduction in *C. parvum* and *G. muris* inactivation of 0.8 log₁₀ and 0.4 log₁₀, respectively, even after the fluence was adjusted for increased absorbance due to the presence of particles. These results indicate that the particulate matter present in natural surface waters may interact with oocysts and cysts and thereby result in a reduction in UV inactivation over and above that attributable to simple absorbance.

Various parameters affect UV radiation performance: differences in output among different types of UV lamps, reactor designs, and chiefly the inability to measure the lamp dose in practice (Betancourt and Rose, 2004); on the other hand, characteristics of the liquid to be disinfected, such as turbidity and concentration of solids in suspension, are considered significant parameters for disinfections (Darby *et al.*, 1993).

In this investigation, the degree of solids in suspension and turbidity showed that the effluent quality was highly variable throughout the study period (Table 3). The reactivation of pathogenic protozoa is a controversial matter with respect to UV treatment efficiency. It is well established that the primary mechanism responsible for cell injury and loss of infectivity by UV radiation is damage to the structure and function of DNA; while Belosevic *et al.* (2001) reported that there exists an inverse relationship between the applied dose and the ability of an organism to repair its damaged DNA, when studying a variety of conditions for the reactivation, Rochelle *et al.* (2005) concluded that there is currently no evidence that UV-exposed *Cryptosporidium* oocysts can repair their DNA sufficiently to regain pre-exposure levels of infectivity. Although the hypothesis of that reactivation may have occurred, we believe that the results obtained in this study were due to the operating conditions present in the WWTP: flow rate (14–15 L/sec when this UV reactor is designed for a flow rate of 7 L/sec) and effluent quality (some samples attain a turbidity value of 25 NTU instead of <2 NTU and solids in suspension reached 34 mg/L when <10 mg/L is recommended) (Darby *et al.*, 1993). To the authors' knowledge there are no data in Brazil about the efficiency of *Giardia* cysts' inactivation, post-UV treatment, by means of animal infectivity assay. It is noteworthy that this study was conducted in real scale and therefore subject to the variations of the operational conditions of a WWTP.

Table 3 Data of effluent quality (turbidity and solids in suspensions) of wastewater treatment plant Samambaia, Campinas/SP, Brazil, during two years

	Quality parameter			
	First year		Second year	
	Turbidity (NTU)	SS ^a (mg/L)	Turbidity (NTU)	SS (mg/L)
Mean	5.72	8.87	6.34	13.65
Minimal	1.75	2.00	2.00	13.00
Maximal	25.10	34.00	18.44	21.00

Note: ^a = solids in suspension

Conclusions

The results of our studies suggest that: (1) the treatment of activated sludge promoted a reduction of cysts of *Giardia* spp. (98.9%) and oocysts of *Cryptosporidium* spp. (99.7%) when the influent and effluent samples were compared; (2) trophozoites were observed in the intestinal scrapings of one mouse which provide direct evidence that the efficiency of inactivation of cysts of *Giardia* spp., post-UV treatment, in the field conditions of the WWTP studied, was not complete.

References

- Amoah, K., Craik, S., Smith, D.W. and Belosevic, M. (2005). Inactivation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts by ultraviolet light in the presence of natural particulate matter. *J. Wat.*, 165–178.
- Belosevic, M., Craik, S.A., Stafford, J.L., Neumann, N.F., Kruithof, J. and Smith, D.W. (2001). Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation. *FEMS Microbiol. Lett.*, **204**, 197–203.
- Betancourt, W.Q. and Rose, J.B. (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.*, **126**(1–2), 219–234.
- Briancesco, R. and Bonadonna, L. (2005). An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. *Env. Monit. Assess.*, **104**, 445–457.
- Craun, G.F. and Via, S.H. (1998). Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *J. AWWA*, **90**, 91.
- Darby, J.L., Snider, K.E. and Tchobanoglous, G. (1993). Ultraviolet disinfection for wastewater reclamation and reuse subject to restrictive standards. *Wat. Env. Res.*, **65**(2), 169–180.
- Franco, R.M.B., Rocha-Eberhardt, R. and Cantusio Neto, R. (2001). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **43**(2), 109–111.
- FUNASA – Fundação Nacional da Saúde (2002). Available www.funasa.gov.br.
- Garcia, A., Yanko, W., Batzer, G. and Widmer, G. (2002). *Giardia* cysts in tertiary-treated wastewater effluents: are they infective? *Wat. Env. Res.*, **74**, 541–544.
- Hachich, E.M., Sato, M.I.Z., Galvani, A.T., Menegon, J.R.N. and Mucci, J.L.M. (2004). *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. *Wat. Sci. Tech.*, **50**(1), 239–245.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2000). Available www.ibge.gov.br.
- Jolis, D., Lam, C. and Pitt, P. (2001). Particle effects on ultraviolet disinfection of coliform bacteria in recycled water. *Wat. Env. Res.*, **73**(2), 233–236.
- Lindquist, H.D.A., Dufour, A.P., Wymer, L.J. and Schaefer, F.W., II (1999). Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. *J. Microbiol. Methods*, **37**, 33–43.
- Maturama, V.M.I., Ares-Mazás, M.E., Duran-Oreiro, D. and Lonrenzo-Lorenzo, M.J. (1992). Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(11), 3514–3516.
- Medema, G.J., Schets, F.M., Teunis, P.F.M. and Havelaar, A.H. (1998). Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(11), 4460–4466.
- Payment, P., Palnet, R. and Cejaka, P. (2001). Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Can. J. Microbiol.*, **47**, 188–193.
- Robertson, L.J., Paton, C.A., Campbell, A.T., Smith, P.G., Jackson, M.H., Gilmour, R.A., Black, S.E., Stevenson, D.A. and Smith, H.V. (2000). *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Wat. Res.*, **34**(8), 2310–2322.
- Rochelle, P.A., Steve, J.U., Montelone, A. and Woods, K. (2005). The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light. *Trends Parasitol.*, **21**(2), 81–87.
- Rose, J.B., Huffman, D.E. and Gennaccaro, A. (2002). Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**, 113–123.
- Santos, L.U., Bonatti, T., Cantusio-Neto, R. and Franco, R.M.B. (2004). Detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge by ether clarification technique and sucrose flotation. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **46**(6), 309–313.
- Savoye, P., Janex, M.L. and Lazarova, V. (2001). Wastewater disinfection by low-pressure UV and ozone: a design approach based on water quality. *Wat. Sci. Tech.*, **43**(10), 163–171.
- Thompson, R.C.A. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.*, **126**, 15–35.

Capítulo 2:

Infectividade de *Giardia* spp. em camundongos BALB/c nude, inoculados com cistos obtidos de efluente de esgoto desinfetado por luz UV (J. Water Health, a ser submetido)*.

*As referências em cada capítulo são apresentadas de acordo com as normas das revistas em questão

Infectividade de *Giardia* spp. em camundongos BALB/c nude, inoculados com cistos obtidos de efluente de esgoto desinfetado por luz UV

Resumo

Giardia spp. é um protozoário que causa gastroenterite no homem e outros animais e é muito comum nos países em desenvolvimento. Em função de seu grande potencial de veiculação hídrica, nas últimas décadas, muitos surtos epidêmicos têm sido registrados no mundo e, o esgoto doméstico foi a fonte de contaminação dos mananciais, na maior parte deles. Na cidade de Campinas/SP a giardiose é endêmica, e este patógeno é detectado em altas concentrações tanto no esgoto bruto como no tratado. Cistos recuperados do efluente de esgoto de uma Estação de Tratamento de Campinas, cujo tratamento é feito em nível secundário pelo processo do lodo ativado, foram avaliados quanto à sua infectividade. Para isso, camundongos BALB/c nude foram inoculados intragastricamente com cistos de *Giardia* spp. desinfetados ou não por luz UV. Todos os animais inoculados com cistos desinfetados pela luz UV desenvolveram a infecção, apresentando um padrão de eliminação de cistos semelhante ao dos animais inoculados com cistos sem a desinfecção por luz UV, porém, com uma concentração inferior. Além dos cistos nas fezes, trofozoítos também foram observados nos cortes histológicos feito com o duodeno dos animais de ambos os grupos.

Introdução

Giardia spp. é um parasito que causa gastroenterite no homem e outros animais, possui uma forma de resistência ambiental (cistos) que é frequentemente detectada em amostras de esgoto em altas concentrações: 10^3 a 10^4 cistos/litro (Carey *et al.*, 2004, Santos *et al.*, 2004).

Este protozoário tem sido associado a numerosos surtos epidêmicos de veiculação hídrica nas últimas décadas em vários países, sendo considerado atualmente um sério problema de saúde pública (Linden *et al.*, 2002). *Giardia* spp. foi responsável por 132 surtos epidêmicos de veiculação hídrica que ocorreram na América do Norte e Europa (Karanis *et al.*, 2007). Na Noruega, 1.500 pessoas foram acometidas pela infecção, sendo considerado o maior surto epidêmico de giardiose já registrado, sendo que a transmissão dos cistos ocorreu via água distribuída à população e o esgoto foi considerado a provável fonte de contaminação do manancial de onde a água era captada (Robertson *et al.*, 2006a e b).

Um surto epidêmico de giardiose envolvendo dois modos de transmissão foi registrado em Boston (EUA): um grupo de crianças se contaminou inicialmente pelo contato com águas recreacionais. A partir destas crianças, um segundo modo de transmissão ocorreu: a forma inter-pessoal, assim, esta infecção se propagou com casos secundários, atingindo os familiares e as pessoas da comunidade que tinham relação com as crianças (Katz *et al.*, 2006).

Os processos convencionais de tratamento de esgoto promovem taxas variáveis de remoção deste patógeno, que vão de 26,0 a 99,0 % porém, não

ocorre a total remoção de cistos de *Giardia* spp. que, presentes no efluente do esgoto, alcançam o ambiente a partir do copo receptor da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) e, nem sempre as ETE aplicam um processo de desinfecção do efluente antes do lançamento. Além disso, cistos de *Giardia* spp. são resistentes aos processos de cloração normalmente usados pelas estações o que agrava este problema (Linden *et al.*, 2002). Em função desta resistência, uma variedade de alternativas à desinfecção por cloração está sendo pesquisada e a radiação por luz ultravioleta (UV) tem recebido muita atenção principalmente por ter reconhecido poder de inativação de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp., outro importante patógeno de veiculação hídrica (Rochelle *et al.*, 2004). A radiação pela luz UV apresenta ainda as vantagens de ser um processo físico, sem adição de produtos químicos e não gerar subprodutos, como o que ocorre com a desinfecção por cloração gasosa e ozonização (Andreadakis *et al.*, 1999, Hassen *et al.*, 2000).

Assim, uma vez no ambiente, a presença de cistos num manancial representa um risco potencial à saúde pública sendo necessário o monitoramento da eficiência dos processos de desinfecção em inativar este patógeno. A eficiência do processo de desinfecção de água e esgoto por luz UV tem sido avaliada por métodos como excitação *in vitro*, corantes fluorogêncios vitais (DAPI e PI) que, de uma maneira geral, subestimam a eficiência destes processos (Craig *et al.*, 2000; Jarney-Swan *et al.*, 2000; Neuman *et al.*, 2000) e, não apresentam correlação com o cultivo celular e infectividade animal (Kato & Bowman, 2002).

Atualmente, apenas os métodos de cultivo celular e infectividade animal

são considerados válidos para inferir a eficiência de desinfecção, isto porque somente estas metodologias permitem observar o desenvolvimento completo do ciclo de vida do parasito. Porém, como *Giardia* spp. é um protozoário extracelular, que se aloja no lúmen intestinal do hospedeiro, o cultivo celular não é uma metodologia de escolha para ele. Assim, o experimento de infectividade em animal é a única maneira de avaliar a infectividade deste importante e comum parasito de veiculação hídrica. No presente estudo, foi avaliado o padrão de eliminação de cistos e presença de trofozoítos, em animais inoculados com baixa dose de cistos que foram obtidos de amostras de efluente de esgoto (desinfetado ou não pela luz UV). Embora todos os animais inoculados com efluente tenham desenvolvido a infecção e, apresentado um padrão semelhante de eliminação de cistos, de uma forma geral, a infecção se mostrou mais branda no grupo de animais inoculados com os cistos que foram desinfetados pela luz UV.

Material e Métodos

A Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Samambaia está localizada à sudeste de cidade de Campinas/SP (latitude sul: 22°56'00" longitude w.Gr. 47°00'00") e trata aproximadamente 70 litros de esgoto doméstico/s pelo sistema de lodos ativados, que promove um tratamento em nível secundário. Neste tipo de tratamento, após a digestão aeróbia da matéria orgânica presente no esgoto bruto, ocorre a formação de flocos que são separados por gravidade, em tanques de decantação e, a parte líquida resultante é o esgoto tratado (efluente), que é lançado no corpo hídrico sem desinfecção prévia. Porém, em caráter

experimental, mas operando em escala real, um reator In-Line 250 Sistema de desinfecção de líquidos por UV– Alta intensidade (Germetec UV & IR Technology Ltda®), foi instalado na ETE e desinfeta o efluente com uma dose de 25 a 30 mJ/cm² (lâmpada UV de média pressão), e um fluxo de 14 a 15 litros de efluente/s. Durante 2 anos, dois litros do efluente desinfetado pela luz UV e do efluente previamente à desinfecção foram coletados quinzenalmente na estação, levados ao laboratório e processados no mesmo dia.

Concentração e sanitização das amostras de efluente

As amostras foram filtradas em membranas de ésteres de celulose (porosidade de 3 µm; diâmetro de 47 mm - Millipore®) e, cada membrana foi eluída por raspagem com alças plásticas e macias alternadas com lavagens com solução de eluição e o líquido resultante, concentrado de acordo com o protocolo de Franco *et al.* (2001). A densidade de cistos de *Giardia* spp. foi determinada pela visualização com reação de imunofluorescência direta (RID) (kit Merifluor® - Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio), e realizado um teste confirmatório da morfologia com corante vital DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindol).

As amostras de efluente, positivas para cistos de *Giardia* spp., foram higienizadas previamente à inoculação nos animais, com hipoclorito de sódio a 1,0 % (60 minutos; 4°C) e, após este período, lavadas com água destilada.

Experimento de infectividade em animal

Grupos de fêmeas de camundongo da linhagem BALB/c nude com idade de

3 a 4 semanas foram monitorizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP), conforme metodologia descrita por Gilioli et al. (1996) e Gilioli et al. (2000). A mutação natural recessiva nude, descrita inicialmente por causar perda de pelos, com pequena sobrevida e baixa fertilidade, em camundongos homozigotos apresentam também um tipo rudimentar que acarreta redução no número de linfócitos induzindo a uma grande susceptibilidade às infecções.

Os animais foram alocados em 4 grupos de acordo com o inóculo: *i*) efluente desinfetado por luz UV (EFL+UV; n = 3); *ii*) efluente sem desinfecção por UV (EFL; n = 3); *iii*) efluente filtrado em membrana de ésteres de celulose (porosidade 3 µm) e portanto livre de cistos de *Giardia* spp. (EFLF; n = 2) e *iv*) animal sentinela – controle negativo, que não recebeu nenhum inóculo (ST; n = 1).

Todos os animais (com exceção do sentinela) foram inoculados intragastricamente com uma dose média de 14 cistos/10 µl; número determinado previamente por RID.

Os animais foram colocados em caixas individualizadas um dia antes da inoculação das amostras e mantidos em isolador confeccionado, testado e esterilizado exclusivamente para esta pesquisa. Foram observados durante os 15 dias de experimento e, do 5º ao 15º dia após a inoculação, as fezes de todos os animais, foram diariamente coletadas e mantidas em dicromato de potássio a 2,0 %. A pesquisa de cistos e trofozoítos foi realizada por análise à fresco das fezes e do conteúdo intestinal e, por confecção em lâminas coradas com Giemsa e por cortes histológicos de acordo com Cantusio Neto et al., (2006). A quantificação do

número de cistos pelo volume de fezes foi feita pela observação direta das formas parasitárias presentes em alíquotas de 10 µl com auxílio de micropipeta, do menisco positivo resultante da flutuação das fezes em solução de sulfato de zinco.

A observação de cistos ou trofozoítos de *Giardia* spp. em qualquer uma das amostras analisadas após a necrópsia dos animais foi interpretada como evidencia direta de infecção.

A análise estatística de comparação das médias foi realizada mediante o emprego do teste *t* de Student. O protocolo deste experimento de infectividade foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), Instituto de Biologia-UNICAMP, sob o n° 909-1.

Resultados

Não foi observado nenhum sinal clínico da doença, como diarreia, nos animais de todos os grupos inoculados incluindo o animal sentinela, durante os 15 dias de experimento. A análise à fresco do raspado intestinal de todos os animais realizada no mesmo dia da necropsia foi negativa para a presença de trofozoíto de *Giardia* spp.

Não foram detectados cistos nas fezes dos animais inoculados com efluente filtrado em membrana com porosidade de 3 µm (EFLF) e nas fezes do animal sentinela (ST). Os resultados negativos no grupo de animais EFLF atestam a higienização realizada nas amostras de esgoto tratado previamente à inoculação nos animais e, a ausência de cistos no animal ST indica que não houve

contaminação dentro do isolador.

Os animais do grupo inoculado com efluente desinfetado por luz UV (EFL+UV) eliminaram cistos nas fezes do 5º dia ao 11º dia após a inoculação. Do 12º dia até o final do experimento, nenhum cisto foi observado nas fezes desses animais. Os animais do grupo que receberam cistos do efluente não desinfetado pela luz UV (EFL) iniciaram a eliminação de cistos nas fezes também a partir do 5º dia após inoculação, porém, esta persistiu até o final do experimento (Fig.1).

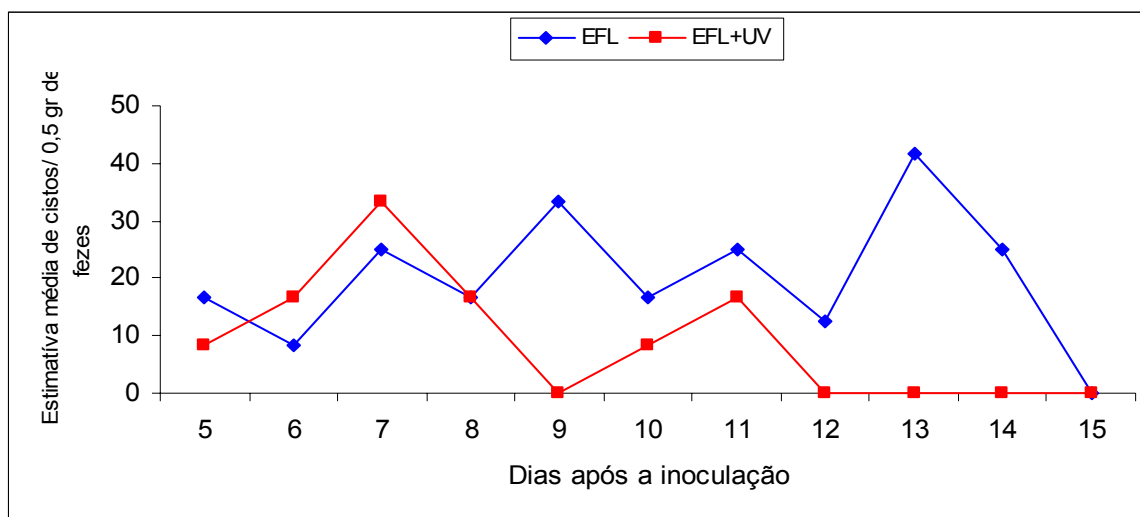


Figura 1. Estimativa média do número de cistos observados nas fezes dos 3 animais de cada grupo, colhidos do 5º dia ao 15º dia após a inoculação.

Analisando os resultados nota-se um padrão similar de eliminação de cistos nas fezes dos animais BABL/c nude para os grupos EFL e EFL+UV, iniciada a partir do 5º dia após a inoculação, porém, com diferença estatística significativa entre elas ($p \leq 0,001$), sendo que um menor número de cistos foi eliminado pelos animais inoculados com cistos irradiados pela luz UV. Este padrão foi caracterizado por uma variação de aumento e queda no número de cistos

eliminados, ao longo de todo o experimento.

Os animais do grupo EFL eliminaram em média de 36,7 cistos/dia (variando de 8,3 a 41,6 cistos/dia) durante os 15 dias de experimento, com um maior número de cistos eliminados no 13º dia. O grupo de animais EFL+UV eliminou em média 16,6 cistos/ dia (variação de 8,3 a 33,3 cistos/dia), com número máximo de cistos eliminados no 11º dia.

As lâminas confeccionadas por aposição do duodeno/íleo dos animais dos grupos EFLF e ST, não foram positivas para trofozoíto. Nos grupos inoculados com cistos, trofozoítos foram observados (Tab.1), sendo que em um animal do grupo EFL+UV, além de trofozoítos foram observados também cistos nas lâminas de aposição (Fig. 2).

Tabela 1. Presença de cistos e trofozoítos nas fezes e em diferentes preparações realizadas a partir do jejuno e íleo de camundongos inoculados com cistos de *Giardia* spp., obtidos de esgoto tratado e desinfetado (ou não) pela luz UV.

Grupos	Cistos (fezes)	Cistos (aposição)	Trofozoítos (aposição)	Trofozoítos (corte histológico)
Efluente+ UV^a	+ ^c (3/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	+ (3/3)
Efluente^b	+ (3/3)	- ^d (0/3)	+ (2/3)	+ (3/3)
Efluente filtrado	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)
Sentinela	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)

^a = efluente desinfetado por UV. ^b = efluente sem desinfecção por UV. ^c = positivo. ^d = negativo.

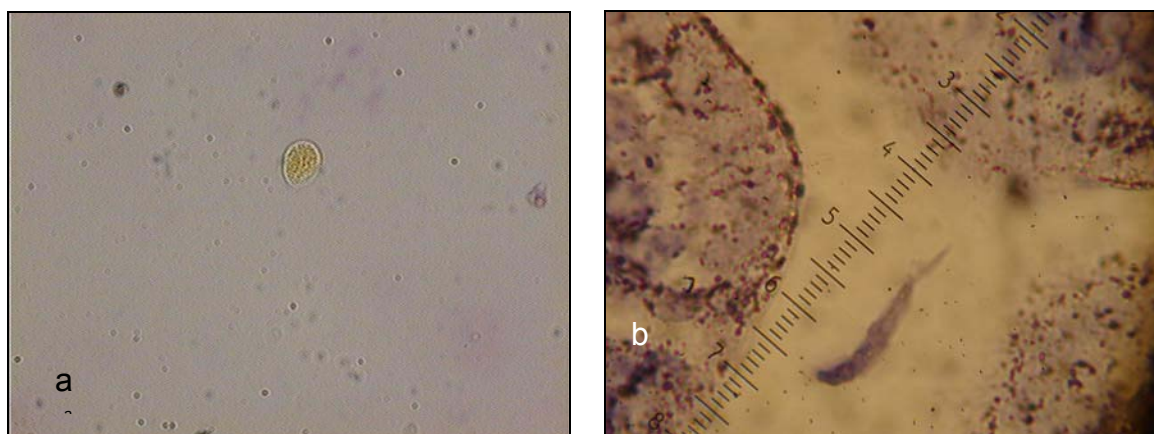


Figura 2. *Giardia* spp. **a:** cisto observado em lâmina de aposição do íleo, coloração por Giemsa (1.000x) **b:** trofozoíto observado em corte histológico realizado com o duodeno (1.000x).

A variabilidade intraespecífica da susceptibilidade dos animais utilizados nos experimentos de infectividade foi evidenciada pela diferença do número de cistos eliminados entre os animais que desenvolveram a infecção, durante todo o experimento (Fig. 3 a e b) e pelo número de trofozoítos encontrados nos cortes histológicos feitos com o intestino de cada animal (Fig. 4).

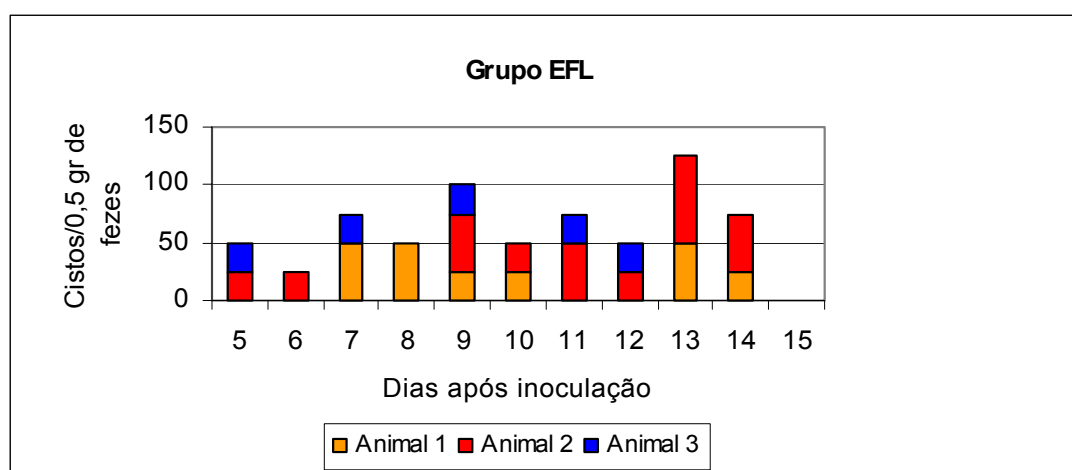


Figura 3 a. Número de cistos eliminados por animal inoculado com efluente de esgoto (sem desinfecção por luz UV), contendo cistos de *Giardia* spp.

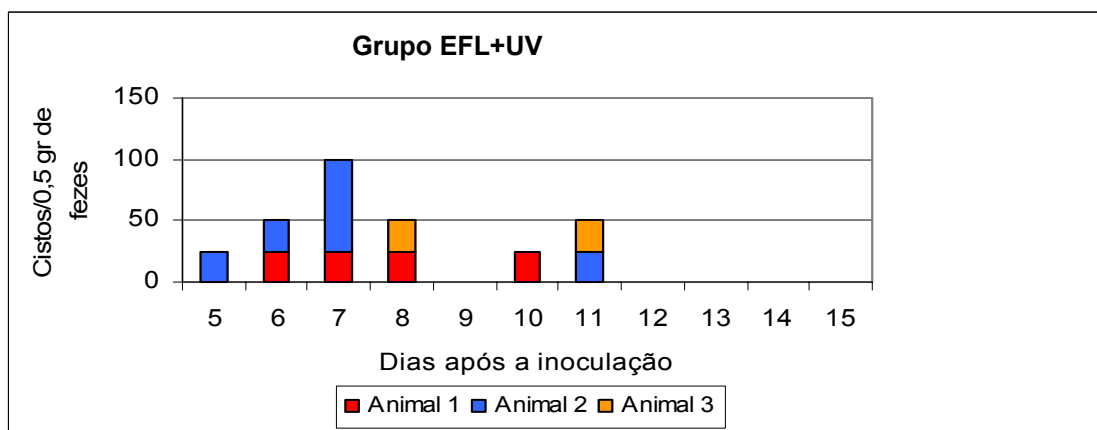


Figura 3b. Número de cistos eliminados por animal inoculado com efluente de esgoto (desinfetado por luz UV), contendo cistos de *Giardia* spp.

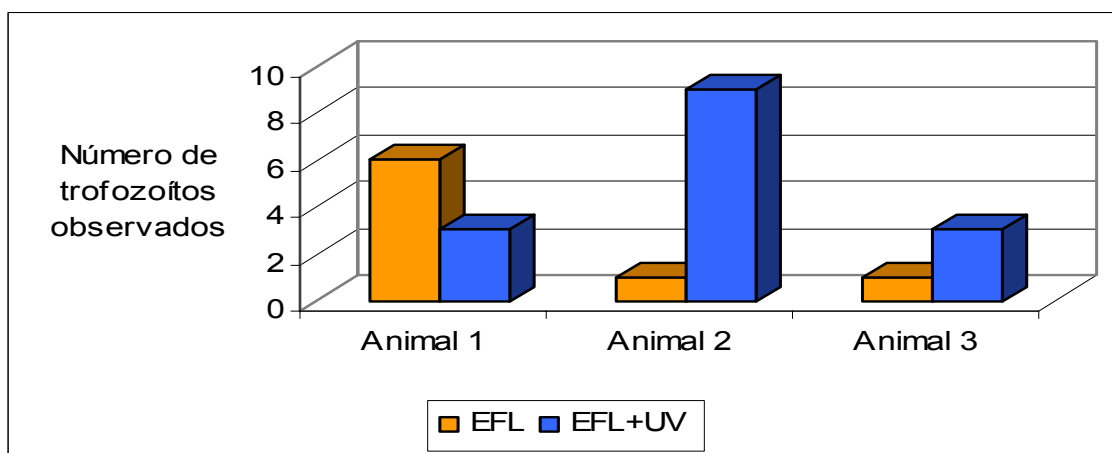


Figura 4. Número de trofozoítos observados nas lâminas de corte histológico de cada animal inoculado com efluente de esgoto (desinfetado ou não por luz UV), contendo cistos de *Giardia* spp.

Discussão

Camundongos da linhagem BALB/c nude mostraram-se susceptíveis à uma baixa dose de cistos de *Giardia* spp., confirmando resultados de outros autores que obtiveram infecção em camundongos e ratos com uma dose de 5 cistos de *G. muris* /animal (Belosevic & Faubert, 1983; Hoff *et al.*, 1985; Labatiuk *et al.*, 1991;

Hayes *et al.*, 2003). A mutação natural recessiva nude, que foi descrita inicialmente por causar perda de pelos em camundongos homozigotos, resultam em um timo rudimentar que acarreta redução no número de linfócitos que induz grande susceptibilidade às infecções, permitindo a utilização de um pequeno número de animais na realização de pesquisas (Pantelouris, 1968, Flanagan, 1996).

O padrão de eliminação de cistos, caracterizado por uma tendência de aumento seguida de queda no número de cistos foi semelhante ao observado em gerbils infectados com *G. duodenalis* (Meyer, 1990). A intermitência na eliminação dos cistos pode explicar o fato de algumas amostras de fezes colhidas durante o experimento serem negativas para cistos de *Giardia* spp., ou ainda pela eliminação de um número tão baixo de cistos que não permitiu sua detecção, considerando que a técnica utilizada é adequada para a recuperação de cistos em amostras fecais. No estudo de Hayes *et al.* (2003), animais inoculados com cistos de *G. muris* também expostos à luz UV, só foram considerados positivos para a infecção após análise do conteúdo intestinal, uma vez que na observação fecal, utilizando também a técnica de flutuação em sulfato de zinco, todas as amostras foram negativas.

A detecção de cistos a partir do 5º dia após a inoculação, corrobora com os resultados obtidos por outros autores, onde a cinética da giardiose, em camundongos, apresenta uma definida correlação entre a dose e o período latente da infecção. Belosevic & Faubert (1983) inocularam entre 10 a 100 cistos/camundongo que começaram a eliminar cistos nas fezes após o 5º dia da

inoculação.

Existe uma marcante diferença na resposta à infecção: como a duração do período de patência e padrão de eliminação de cistos, para as diferentes linhagens de camundongos usadas em experimentos animais. Belosevic *et al.* (1984) avaliaram algumas dessas linhagens e, ao inocularem uma dose de 1.000 cistos/camundongos adultos BALB/c, esta linhagem mostrou capacidade de eliminar a infecção num curto período de tempo quando comparado às outras linhagens.

O estudo com modelos animais está sujeito às variabilidades (Hoff *et al.*, 1985; Clancy *et al.*, 2000; Linden *et al.*, 2002; Rochelle *et al.*, 2002) que ocorrem devido à fatores intrínsecos do parasito como: integridade dos cistos inoculados e a cepa do parasito e, em relação ao hospedeiro, como a diferença de susceptibilidade individual à infecção (Belosevic & Faubert, 1986). A complexidade e o uso de protocolos diferentes são outros importantes fatores que favorecem a variabilidade de resultados nos experimentos de infectividade animal (Clancy *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que para a aquisição desta parasitose, baixas doses são suficientes, pois 100 % dos animais que receberam cerca de 14 cistos desenvolveram a infecção, mesmo com ausência de sinais clínicos. Os animais do grupo EFL+UV apresentaram padrões de comportamento da infecção semelhantes ao dos animais do grupo EFL, mas, de uma forma geral, a infecção se mostrou mais branda no grupo EFL+UV, o que poderia indicar a

ocorrência de um dano ao DNA causado pela radiação UV em alguns cistos.

Ao inocular uma dose de 14 cistos/ animal, existe a possibilidade de que alguns destes cistos tenham sido inativados. Embora alguns trabalhos indiquem que *Giardia* spp. é susceptível à radiação de luz UV com dose menores que 20 mJ/cm², muitos fatores, entre eles a qualidade do líquido a ser desinfetado, influenciam na eficiência da desinfecção pela luz ultravioleta. Como a radiação deve atingir o protozoário diretamente para gerar danos ao DNA, a turbidez e os sólidos em suspensão são parâmetros significativos em relação a eficiência deste processo, pois podem causar refração e/ou absorção da radiação UV antes que ela alcance o patógeno (Darby *et al.*, 1993). Jolis *et al.* (2001) observaram que a taxa de inativação de coliformes foi inversamente proporcional à quantidade de partículas maiores que 7 µm em amostras de efluente desinfetado por UV.

É importante ressaltar que a ETE avaliada neste estudo apresentou problemas na qualidade do efluente produzido em função de falhas no tratamento, incluindo a quebra de equipamentos, gerando a elevação da idade do lodo ativado o que conseqüentemente, comprometeu o processo de tratamento do esgoto.

Considerando que a turbidez das amostras que foram utilizadas no teste de infectividade animal variou de 1,75 a 25,00 NTU e, os sólidos em suspensão variaram de 2,00 a 34,00 mg/litro, estes fatores contribuíram para a baixa qualidade do efluente produzido o que poderia explicar a inativação parcial dos cistos de *Giardia* spp. presentes no efluente (Cantusio Neto *et al.*, 2006).

Estes resultados têm grande relevância em saúde pública: considerando-se que o método convencional de tratamento de esgoto por lodo ativado não

promove a remoção total de protozoários patogênicos e, a desinfecção por luz UV pode não inativá-los totalmente, previamente ao seu lançamento no ambiente, em um corpo hídrico. Assim, se este corpo hídrico é utilizado como fonte de captação de água para uma população, existe a possibilidade de que as pessoas, ao ingerirem esta água, se infectem com baixa dose de cistos e desenvolvam giardiose subclínica, como evidenciado a partir dos resultados obtidos neste estudo, quando modelos animais desenvolveram a forma subclínica desta parasitose. Desta forma, a falta de sintomas clínicos pode não levar à procura pelo tratamento e, com isso, esses indivíduos atuarão como uma importante fonte de dispersão do protozoário.

Mesmo com sua inerente variabilidade, o teste de infectividade animal, ainda é o único método válido para avaliar a eficiência dos diversos processos de desinfecção em inativar cistos de *Giardia* spp., em amostras de água e esgoto. Assim, mais pesquisas são necessárias para a obtenção de protocolos padronizados, com o intuito de minimizar estas variáveis e obtermos um eficiente instrumento para uma vigilância epidemiológica sobre todo o esgoto tratado antes de seu lançamento no ambiente.

Referências bibliográficas

- Andreadakis, A., Mamais, D., Christoulas, D. & Kabylafka, S. 1999. Ultraviolet disinfection of secondary and tertiary effluent in the Mediterranean region. *Wat. Sci. Tech.* **40**: 253-260.
- Belosevic, M.; Faubert, G.M.; Skamene, E.; MacLean, J.D. 1984. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Giardia muris*. *Infec. Immun.* **44** (2): 282-286.
- Belosevic, M. & Faubert, G.M. 1986. *Giardia muris*: correlation between oral

dosage, course of infection and trophozoite distribution in the mouse small intestine. *Exp. Parasitol.* **56**: 93-100.

Cantusio Neto, R., Santos L.U. & Franco R.M.B. 2006. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at sludge treatment plant in Campinas, South east of Brazil. *Water Sci. Technol.* **54** (3): 89-94.

Carey C.M., Lee H. & Trevors, J.T. 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* **38**: 818-862.

Clancy, J.L., Bukhari, Z., Sterling, C.R., Marshall, M.M., Korich, D.G., Schaefer III F.W. & Rosen J.S. 2000. Cell culture method not yet viable. *J. AWWA* **92** (4): 4-6.

Craik, S.A., Finch, G.R., Bolton, J.R. & Belosevic, M. 2000. Onactivation of *Giardia muris* cysts using medium-pressure ultraviolet radiation in filtered drinking water. *Wat. Res.* **34**: 4325-4332.

Darby, J.L., Snider, K.E. & Tchobanoglous, G. 1993. Ultraviolet disinfection for wastewater reclamation and reuse subject to restrictive standards. *Wat. Env. Res.* **65** (2), 169-180.

Flanagan, S.P. 1996. "Nude" a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetic Res.* **8**: p295-309.

Franco, R.M.B., Rocha-Eberhardt, R. & Cantusio Neto, R. 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* **43** (2): 109-111.

Gilioli, R.; Sakurada, J.K.; Andrade, L.A.G.; Kraft, V.; Meyer, B.; Rangel, H.A. 1996. Virus infection in rat and mouse colonies reared in brazilian animal facilities. *Lab. Anim. Sci.* **46** (5): 582-584,

Gilioli, R.; Andrade, L.A.G.; Passos, L.A.C.; Silva, F.A.; Rodrigues, D.M.; Guaraldo, A.M.A. 2000. Parasite survey in mouse and rat colonies of brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **52** (1): 33-37.

Hassen, A., Mahrouk, M., Ouzari, H., Cherif, M., Boudabous, A. & Damelincourt, J.J. 2000. UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot lant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. *Bioresource Tech.* **74**: 141-150.

Hayes, S.L.; Rice, E.W.; Ware M.W. & Schaefer III, F.W. 2003. Low pressure ultraviolet studies for inactivation of *Giardia muris* cysts. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 54-59.

Hoff J.C.; Rice E.W. & Schaefer III. 1985. Comparison of animal infectivity and excystation as measures of *Giardia muris* cysts inactivation by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** (4): 1115-1117.

Jarmey-Swan, J.; Gibbs, R.A.; Ho, G.E.; Bailey, I.W. & Howgrave-Graham, R. 2000. A novel method for detection of viable *Giardia* cysts in water samples. *Wat. Res.* **34**: 1948-1951.

Jolis, D., Lam, C. & Pitt, P. 2001. Particle effects on ultraviolet disinfection of coliform bacteria in recycled water. *Wat. Env. Res.* **73** (2), 233-236.

Karanis, P.; Kourenti, C. & Smith, H. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health* **5** (1): 1-38.

Kato, S. & Bowman, D.D. 2002. Using flow cytometry to determine the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts extracted from spiked environmental samples in chambers. *Parasitol. Res.* **88**: 326-331.

Katz, D.E.; Heisey-Grove, D.; Beach, M.; Dicker, R.C. & Matyas, B.T. 2006. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. *Epidemiol. Infect.* 1-7.

Labatiuk, C.W.; Schaefer Iii, F.W.; Finch, G.R.; Belosevic, M. 1991. Comparison of animal infectivity, excystation and, fluorogenic dye as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (11): 3187-3192.

Linden, K.G., Am- Shin, G.W.Y., Faubert, G., Cairns, W. & Sobsey, M.D. 2002. UV disinfection of *Giardia lamblia* cysts in water. *Environ. Sci. Tech.* **36**: 2519-2522.

Meyer, E.A. Human parasitic diseases. Vol. 3 Elsevier , 1 ed. 368 pp., 1990.

Neuman, N.F., Gyürék, L.L., Finch, G.R. & Belosevic, M. 2000. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after *in vitro* excystation are infectious to neonatal mice. *FEMS Microbiol. Letters* **183**: 331-336.

Pantelouris, E.M. 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* **217**: 370-671.

Robertson L.J., Hermansen, L. & Gjerde, B.K. 2006a. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (8): 5297-5303.

Robertson L.J., Hermansen, L. Gjerde, B.K., Strand, E., Alvsvag, J.O., Langeland, N. 2006b. Application of genotyping during extensive outbreak of

waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (3): 2212-2217.

Rochelle, P.A., Marshall, M.M., Mead, J.R., Johnson, A.M., Korich, D.G., Rosen, J.S. & Leon, D.R. 2002. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3809-3817.

Rochelle, P.A., Fallar, D., Marshall, M.M., Montelone, B.A., Upton, S.J. & Woods, K. 2004. Irreversible UV inactivation of *Cryptosporidium* spp. Despite the presence of UV repair genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**: 553-562.

Santos L.U., Bonatti T.R., Cantusio Neto R. & Franco R.M.B. 2004. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **46** (6): 309-313.

Considerações

Desde que um aumento nos surtos epidêmicos de gastroenterite por veiculação hídrica foi notificado em todo o mundo, a preocupação com a qualidade dos mananciais aumentou. A degradação dos corpos hídricos é principalmente ocasionada pela descarga de esgotos que em geral são lançados *in natura* no ambiente e contamina as águas com organismos patogênicos. A falta de saneamento básico é refletida pelas doenças de veiculação hídrica que são responsáveis por 1 milhão de internações hospitalares no Brasil, cerca de 2/3 do total (FUNASA - Ministério da Saúde, 2002) sendo que, investimentos na área de abastecimento de água e esgotamento sanitário são mais efetivos a longo prazo na prevenção de doenças de veiculação hídrica do que programas de vacinação, por exemplo (www.sabesp.com.br). Segundo dados da Associação Brasileira da Infra-Estrutura e Indústrias de Base (ABDIB), serão necessários investimentos na ordem de R\$ 10 bilhões por ano para diminuir de 63 anos para 20 anos a universalização dos serviços de tratamento de água e esgoto (www.abidic.gov.br).

A ETE Samambaia trata o esgoto de aproximadamente 40 mil habitantes, distribuídos em 25 bairros e, ao ser inaugurada há 5 anos atrás, teve um custo de R\$ 6 milhões. Porém, a tendência atual de modelos para construção de ETE, que é a aplicação de processos anaeróbios combinados com processo de pós-tratamento aeróbio ou físico químico, necessita de investimentos maiores. ETE que operam com este sistema combinado custam cerca de R\$ 50 milhões para a sua implantação, além do custo operacional. Porém, em alguns casos o custo operacional pode ser minimizado em função do tipo de construção escolhida.

Uma vez construída, a ETE necessita ter o seu funcionamento constantemente monitorado; investigações dos diversos patógenos presentes no esgoto bruto e a sua permanência ou não no esgoto tratado não são apenas um parâmetro do funcionamento da ETE, mas também um importante banco de informações. A detecção no esgoto de agentes etiológicos que causam enfermidades ao homem, pode indicar o nível de circulação dos mesmos na população atendida pela ETE, contribuindo para o conhecimento epidemiológico das enfermidades e dos riscos para a Saúde Pública (CARRARO et al., 2000).

No afluente da ETE Samambaia, durante o biênio avaliado, com periodicidade quinzenal, cistos de *Giardia* spp. foram mais abundantes que oocistos de *Cryptosporidium* spp. em todas as amostras de esgoto avaliadas. A eficiência do processo de lodo ativado da ETE em remover estes patógenos, foi feita com base no número de oocistos e cistos observado no afluente e no efluente. O cuidado em emparelhar as amostras, colhendo o efluente após o tempo de detenção do tratamento da Estação, assegurou a correspondência entre elas, permitindo uma estimativa da real eficiência do tratamento (ROBERTSON et al., 2006).

As metodologias empregadas neste estudo mostraram-se eficientes na detecção de cistos e oocistos em amostras de esgoto, bruto ou tratado. Um levantamento retrospectivo dos casos positivos de criptosporidiose nos centros de saúde que atendem à aquela região, poderia contribuir para elucidar a epidemiologia da criptosporidiose no município de Campinas. A idéia deste levantamento foi frustrada pela informação de que não são solicitados exames

visando a detecção de *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais obtidas nos centros de saúde, mesmo com diagnóstico de diarreias, este protozoário não entra na lista dos patógenos a serem avaliados.

A metodologia de concentração do esgoto bruto empregada neste estudo, que não incluía uma etapa de purificação teve por objetivo minimizar a perda dos protozoários que pode ocorrer quando se opta por uma metodologia com várias etapas laboratoriais e, a avaliação de pequenos volumes se mostrou eficiente para a detecção, sendo indicada para amostras onde altas concentrações de patógenos são plausíveis (HÄNNINEN et al. 2005, ZUCKERMAN et al.1997; CARRARO et al. 2000).

Para o esgoto tratado, o processo de filtração em membrana baseado em uma metodologia já utilizada para a detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água bruta superficial, adaptada por Franco et al. (2001), mostrou-se também eficiente na recuperação de oocistos e cistos presentes no efluente de esgoto.

Ambas as metodologias utilizadas nesta investigação são simples, fáceis e mostraram-se eficientes na recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. podendo ser adotadas pelas ETE, para um monitoramento da ocorrência destes protozoários patogênicos, desde que estas contem com recurso humano técnico especializado para as análises. As taxas de recuperação dos organismos obtidas nos experimentos controle positivo (58,8 e 124,0 % dos cistos, utilizando filtração em membrana e centrífugo concentração, respectivamente e, 26,6 e 65,8 % dos oocistos com filtração em membrana e

centrífugo concentração, respectivamente), atestam esta eficiência e, os resultados dos experimentos controle negativo, revelam a ausência de contaminação durante a execução de todas as análises realizadas no presente estudo.

É digno de menção que, durante a leitura das diversas preparações empregando epifluorescência, RID, não foram observadas alterações morfológicas em alguns dos cistos detectados nas amostras de esgoto tratado (Fig. 1); embora uma comprovação definitiva somente seja obtida mediante bioensaio, tal fato evidencia que o processo de tratamento de esgoto por lodo ativado pode não causar danos significativos algum às formas de resistência deste protozoário.



Figura 1. Cisto de *Giardia* spp. observado em amostra de efluente da ETE Samambaia. RID (500x)

A despeito da alta taxa de remoção de cistos de *Giardia* spp., as formas presentes no efluente lançado pela ETE Samambaia no córrego Samambaia estavam infectantes mesmo após serem desinfetadas pela luz UV, o que foi comprovado no teste de infectividade em animal. O uso de um modelo animal

adequado para avaliação da infectividade de *Giardia* spp., como a linhagem BALB/c nude, permitiu a realização do experimento com número relativamente pequeno de animais e, embora com a variabilidade inerente ao teste de infectividade, os resultados mostraram-se coerentes, confirmando a aplicabilidade deste protocolo para análise na área ambiental.

Vários fatores podem ter contribuído para a baixa eficiência do reator de luz UV na total inativação dos cistos, verificada neste estudo; dentre esses, pode-se considerar a baixa qualidade do efluente desinfetado, como indicado pela turbidez das amostras avaliadas, as variações do fluxo e o desígnio operacional que incluiu a vazão de 12 a 15 litros/s, na fase experimental, que correspondeu ao biênio na qual foi conduzida esta investigação.

A disposição de efluentes de esgoto tem sido uma constante preocupação por parte das ETE e dos órgãos ambientais, sendo que a avaliação prévia antes do seu lançamento é vista como uma importante ferramenta para um maior e melhor controle da contaminação dos mananciais em todo o mundo. Por isso, esta análise está sendo cada vez mais indicada por pesquisadores da área de parasitologia, saneamento e de Saúde Pública, como uma importante forma de conhecimento da epidemiologia destes patógenos e do grau de contaminação dos mananciais usados como fontes de captação de água para tratamento e distribuição (ROBERTSON, et al., 2006).

Conclusões

1) Cistos de *Giardia* spp. foram detectados na maioria das amostras de afluente (90,5 %) da ETE Samambaia com uma concentração média de $1,0 \times 10^5$ cistos/litro.

2) Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em duas amostras de afluente (representando 3,7 % das amostras) em concentração média de $6,0 \times 10^4$ oocistos/litro.

3) Nas amostras de efluente da ETE Samambaia, cistos de *Giardia* spp. foram detectados em 96,2 % delas com uma concentração média de $1,1 \times 10^3$ cistos/litro.

4) Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em apenas uma amostra (2,6 %) na concentração de $1,6 \times 10^2$ oocistos/litro.

5) O processo de lodo ativado utilizado para o tratamento de esgoto da ETE Samambaia apresentou uma eficiência de 98,8 % na redução de cistos de *Giardia* spp. e de 99,7 % na redução de oocistos de *Cryptosporidium* spp. quando comparado o número de cistos detectados no esgoto bruto e no esgoto tratado.

6) Nas condições avaliadas, o reator de luz U.V. instalado na ETE Samambaia não foi capaz de inativar totalmente os cistos de *Giardia* spp. remanescentes no esgoto tratado, como verificado em teste de infectividade animal.

7) Camundongos da linhagem BALB/c nude inoculados com amostras de esgoto tratado e desinfetado por luz UV, contendo em média 14 cistos de *Giardia* spp. infectaram-se como evidenciado a partir da eliminação de cistos nas fezes e

da presença de trofozoítos observados nas lâminas de cortes histológicos.

Referência Bibliográfica

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin. Microbiol. Rev.** **14 (3)**: 447-475, 2001.

AIYUK, S.; FORREZ, I.; LIEVEN, D.E. K.; HAANDEL, A.; VERSTRAETE, ADRIANUS. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates – A review. **Bioresour. Tech.** **97**: 2225-2241, 2006.

ALDEEN, W.E.; CARROL, K.; ROBISON, A.; MORRISON, M.; HALE, D. Comparison of nine commercially available enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. **J. Clin. Microbiol.** **36 (5)**: 1338-1340, 1998.

ALÉM SOBRINHO P. **Tratamento de esgoto e geração de lodo**. In: Tssutiya, M.T. et al. p. 7-40, 2001.

ALI, S.A.; HILL D.R. *Giardia intestinalis*. **Curr. Opin. Infec. Dis.** **16**: 453-460, 2003.

ANDREADAKIS, A; MAMAS, D; CHRISTOULAS, D; KBYLAFKA, S. Ultraviolet disinfection of secondary and tertiary effluent in the Mediterranean region. **Wat. Sci. Tech.** **40**: 253-260, 1999.

ANDREOLI, C.V.; CARNEIRO, C. Avaliação do comportamento vertical de nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal e p.H. em leiras de lodo de esgoto caedado. **Sanare – Rev. Téc. da Sanepar**, **18 (18)**: 63-70, 2002.

ARAKI, S.; MARTÍN-GOMEZ, S.; BÉCARES, E.; LUIS-CALABUIG, E.; ROKO-VASQUEZ, F. Effect of high-rate algal ponds on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** **67 (7)**: 3322-3324, 2001.

BAURÉS, E.; BERHO, C.; POUET, M.F.; THOMAS, O. In situ UV monitoring of wastewater: a response to sample aging. **Wat. Sci. Tech.** **49 (1)**: 47-52, 2004.

BELOSEVIC, M.; CRAIK, S.A.; STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; KRUTHOF, J.; SMITH, D.W. Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation. **FEMS Microbiol. Lett.** **204**: 197-203, 2001.

BENÍCIO M.E.D.A.; FERREIRA, M.U.; CARDOSO, M.R.A.; KONNO, S.C.; MONTEIRO, C.A. Wheezing conditions in early childhood: prevalence and risk factors in the city of São Paulo, Brazil. **Bull. WHO** **82 (7)**: 516-522, 2004.

BETRAN, I.; SCHWARTZBROD, J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. **Wat. Res.** *in press*, 2007.

BLACKBURN, B.; MAZUREK, J.M.; HEAVSA, M.; PARK, J.; TELLAPAW, M.; PARRISH, M.; SALEHI, E.; FRANKS, W.; KOCH, E.; SMITH, F.; XIAO, L.; ARROWOOD, M.; HILL, V.; SILVA, A.; JOHNSTON, S.; JONES, J.L. Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. **Emerging Inf. Dis.** **12 (4)**: 684-686, 2006.

BOLTER-BITZER, J.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. **Biotechnol. Adv.** **25**: 13-44, 2007.

BONATTI, T.R.; FRANCO, R.M.B.; CANTUSIO NETO, R. Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil. **J. Water Health**, *in press*, 2007.

BONFIM, T.C.B. Determinação de espécies de *Cryptosporidium* no Estado do Rio de Janeiro obtidas de diferentes hospedeiros animais. **1º Fórum de Discussão do Eixo São Paulo-Rio de Janeiro sobre a Epidemiologia Molecular de *Cryptosporidium*** Campinas/SP, Dezembro de 2006.

BOWMAN, D.D. What's in a name? **TRENDS Parasitol.** **21 (6)**: 267-269, 2005.

BRAGA, B.; PORTO, M.; TUCCI, C.E.M. **Monitoramento de quantidade e qualidade das águas**. In: Águas doces no Brasil – capital ecológico, uso e conservação. REBOUÇAS AC, BRAGA B, TUNDISI JG. 2ª ed. Editora Escrituras, São Paulo, 2002.

BRANCO, S.M. **Água, meio ambiente e saúde** In: Águas doces no Brasil – capital ecológico, uso e conservação. REBOUÇAS AC, BRAGA B, TUNDISI JG. 2ª ed. Editora Escrituras, São Paulo, 2002.

BUKHARI, Z.; SMITH, H.V.; SYKES, N. HUMPHREYS, S.W.; PATON, C.A. GIRDWOOD; FRICKER, C.R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* spp cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. **Wat. Sci. Tech.** **35 (11-12)**: 385-390, 1997.

BUSTAMANTE, H.A.; SHANKER, S.R.; PASHLEY, R.M.; KARAMAN, M.E. Iteration between *Cryptosporidium* oocysts and water treatment coagulants. **Wat. Res.** **35 (13)**: 3179-3189, 2001.

CACCIÓ, S.M.; DE GIACOMO, M.; AULICINO, F.A.; POZIO, E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. **Appl. Environ. Microbiol.** **69 (6)**: 3393-3398, 2003.

CACCIÓ, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; McLAUCHLIN, J.; SMITH, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **TRENDS in Parasitol.** **21 (9)**: 430-

437, 2005.

CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, L.U.; FRANCO, R.M.B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. **Wat. Sci. Tech.** **54 (3)**: 89-94, 2006.

CAREY, C.M.; LEE, H; TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Wat. Res.** **38**: 818-862, 2004.

CARMENA, D.; AGUINAGALDE, X.; ZIGORRAGA, C.; FERNÁNDEZ-CRESPO, J.C.; OCIO, J.A. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. **J. Appl. Microbiol.** **102**: 619-629, 2007.

CARRARO, E.; FEA, E.; SALVA, S.; GILLI, G. Impact of wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in surface water. **Wat. Sci. Tech.** **47 (7)**: 31-37, 2000.

CARVALHO-ALMEIDA, T.T; PINTO, P.L.; QUADROS, C.M.; TORRES, D.M.; KANAMURA, H.Y.; CASIMIRO, A.M. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** **48 (1)**: 27-32, 2006.

CHAURET, C.; ARMSTRONG, N.; FISHER, J.; SHARMA, R.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. **J. AWWA** **87**: 76-84, 1995.

CHEN, S.; XU, M.; CAO, H.; ZHU, J.; ZHOU, K.; XU, J.; YANG, X.; GAN, Y.; LUI, W.; ZHAI, J.; SHAO, Y. The activated-sludge fauna and performance of five sewage treatment plants in Beijing, China. **Euro. J. Protistol.** **40**: 147-152, 2004.

CHOI, M.H.; HONG, S.T.; CHAI, J.Y.; PARK, W.Y.; YU, J.R. In vitro culture of *Cryptosporidium muris* in a human stomach adenocarcinoma cell line. **Korean J. Parasitol.** **42(1)**: 27-34, 2004.

CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z.; MCCUIN, R.M.; MATHESON, Z.; FRICKER, C.R. USEPA method 1622. **J. AWWA** **91 (9)**: 60-68, 1999.

CLANCY, J.L.; BUKHARI Z.; STERLING, C.R.; MARSHALL, M.M.; KORICH, D.G.; SCHAEFER III, F.W.; ROSEN J.S. Cell culture method not yet viable. **J. AWWA** **92 (4)**: 4-6, 2000.

CLANCY, J.L.; McCUIN, R.M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* in wastewaters in the US. **J. AWWA** WQTC Conference, 2003.

COFIE, O.O.; AGBOTTAH, S.; STRAUSS, M.; ESSEKU, H.; MONTANGERO, A.; AWUAH, E.; KONE, D. Solid-liquid separation of faecal sludge using drying beds in Ghana: Implications for nutrients recycling in urban agriculture. **Wat. Res.** **40**: 75-82, 2006.

CORSO, P.S.; KRAMER, M.H.; BLAIR, K.A.; ADDESS, D.G.; DAVIS, J.P.; HADDIX, A.C. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging. Infec. Dis.** **9 (4)**: 426-431, 2003.

CRAIK, S.A., FINCH, G.R., BOLTON, J.R., BELOSEVIC, M. Onactivation of *Giardia muris* cysts using medium-pressure ultraviolet radiation in filtered drinking water. **Wat. Res.** **34 (18)**: 4325-4332, 2000.

CRAUN, G. F.; HUBBS, S. A.; FROST, F.; CALDERON, R. L.; VIA, S. H. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **J. AWWA** **90 (9)**: 81-91, 1998.

DALL'OLI, A.J.; FRANCO, R.M.B. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do Sudeste Brasileiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** **56 (1)**: 25-31, 2004.

DAI, X.; HOZALSKI, R.M. Effect of NOM and biofilm on the removal of *Cryptosporidium parvum* oocysts in rapid filters. **Wat. Res.** **36**: 3523-3532, 2002.

DAI, X.; BOLL, J.; HAYES, M.E.; ASTON, D.E. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solids surface: the role of surface charge and hydrophobicity. **Colloids Surf. B: Biointerfaces** **34**: 259-263, 2004.

DAI, X.; BOOL, J. Settling velocity of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. **Wat. Res.** **40**: 1321-1325, 2006.

DE CARVALHO T.B.; DE CARVALHO L.R.; MASCARINI L.M. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp. *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. **Rev. Med. Trop. São Paulo** **48 (5)**: 269-273, 2006.

DIAS JUNIOR, O. Ocorrência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em águas superficiais e esgoto no município de Araras/SP. **Dissertação de Mestrado – Universidade Presbiteriana Mackenzie.** **110p.**, 1999.

EDERLI, B.B.; CARVALHO, C.B.; SALES, L.G. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no

norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** **13 (2)**: 45-48, 2004.

ESFANDIARI, A.; JORDAN, W.C.; BROWN, C.P. Prevalence of enteric parasitic infection among HIV-onfected attendees o fan inner city AIDS clinic **Cell. Mol. Biol.** **41 (1)**: S19-S23, 1995.

FACILE, N.; BARBEAU, B.; PRÉVOST, M.; KOUDJONOU, B. Evaluating bacterial aerobic spores as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium* inactivation by ozone. **Wat. Res.** **34 (12)**: 3238-3246, 2000.

FAUST, E.C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D.R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. **J. Parasitol.** **25**: 241-262, 1939.

FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian J. Microbiol.** **33 (1)**: 41-43, 2002.

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin. Microbiol. Rev.** **13 (1)**: 35-54, 2000.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.** **30**: 1305-1322, 2000.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Vet. Parasitol.** **126**: 37-56, 2004.

FAYER, R.; SANTIN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **J. Parasitol.** **91 (3)**: 624-629, 2005.

FELTUS, D.C.; GIDDINGS, W.C.; SCHNECK, B.L.; MONSON, T.; WARSHAUER, D.; MCEVOY, J.M. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. **J. Clin. Microbiol.** **44 (12)**: 4303-4308, 2006.

FINNE-RIMHANEN, R.; HÖRMAN, A.; RONKAINEN, P.; HÄNNINEN, M.L. An IC_PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. **J. Microbiol. Methods** **50**: 299-303, 2002.

FIKAR, M.; CHACHUAT, B.; LATIFI, M.A. Optimal operation of alternating activate sludge processes. **Control. Eng. Prac.** **13**: 853-861, 2005.

FLANAGAN, S.P. "Nude" a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. **Genetic Res.** **8**: p295-309, 1996.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** **43 (2)**: 109-111, 2001.

FREIRE-SANTOS, F.; OTEIZA-LÓPEZ, A. M., VERGARA-CASTIBLANCO, C.A.; ARES-MAZÁS, E. Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. **Vet. Parasitol.** **89**: 253-259, 2000.

FRERREIRA, P.; LIMA, M.R.; OLIVEIRA, F.B.; PEREIRA, M.L.M.; RAMOS, L.B.M.; MARÇAL, M.G.; COSTA-CRUZ, J.M. Ocorrência de parasitas e comensais intestinais em crianças de escola localizada em assentamento de sem-terras em Campo Florido, MG, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **36 (1)**: 109-111, 2003.

FRICKER, C.R.; CRABB, J. Waterborne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. **Adv. Parasitol.** **40**: 241-278, 1998.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUSANA). Surto de doença diarreica aguda por *Cyclospora cayetanensis*, Antonina, Paraná. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, **3**: 1-9, 2002.

GAJADHAR, A.A.; ALLEN, J.R. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. **Vet. Parasitol.** **126**: 3-4, 2004.

GAMBA, R.C.; CIAPINA, E.M.P.; ESPÍNDOLA, R.S.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* sp oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S.Paulo – Brazil. **Brazilian J. Microbiol.** **31**: 151-153, 2000.

GASSER, R.B.; O'DONOGHUE, P. Isolation, propagation and characterization of *Cryptosporidium*. **Int. J. Parasitol.** **29**: 1379-1413, 1999.

GATEI, W.; DAS, P.; DUTTA, P.; SEN, A.; CAMA, V.; LAL, A.A.; XIAO, L. Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, Índia. **Inf. Genetics. Evol.** **7**: 197-205, 2007.

GIROUARD, D.; GALANT, J.; AIYOSHI, D.E.; NUNNARI, J.; TZIPORI, S. Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. **J. Parasitol.** **92 (2)**: 399-406, 2006.

GONÇALVES, E.M.N.; SILVA, A.J.; EDUARDO, M.B.P.; UEMURA, I.H.; MOURA, I.N.S.; CASTILHO, V.L.P.; CORBERTT, C.E.P. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics** **6** (2): 119-126, 2006.

GRACZYK, T.K.; FAYER, R.; CRANFIELD, M.R.; CONN, D.B. Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula flumines*). **Appl. Environ. Microbiol.** **64** (2): 427-430, 1998.

GRACZYK, T.K.; LUCY, F.E. Quality of reclaimed waters: a public health need for source tracking of wastewater-derived protozoan enteropathogens in engineered wetlands. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** **101**: 532-533, 2007.

GILIOLI, R.; SAKURADA, J.K.; ANDRADE, L.A.G.; KRAFT, V.; MEYER, B.; RANGEL, H.A. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Lab. Anim. Sci.** **46** (5): 582-584, 1996.

GILIOLI, R.; ANDRADE, L.A.G.; PASSOS, L.A.C.; SILVA, F.A.; RODRIGUES, D.M.; GUARALDO, A.M.A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** **52** (1): 33-37, 2000.

GUY, R.A.; XIAO, C.; HORGAN, P.A. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. **J. Clin. Microbiol.** **42** (7): 3317-3320, 2004.

HAFIANE, A.E.L.; HAMOURI, B.E.L. Anaerobic reactor/high rate pond combined technology for sewage treatment in the Mediterranean area. **Wat. Sci. Tech.** **51** (12): 125-132, 2005.

HACHICH, E.M.; SATO, M.I.Z.; GALVANI, A.T.; MENEGON, J.R.N.; MUCCI, J.L.N. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of Sao Paulo State, Brazil. **Wat. Sci. Tech.** **50** (1): 239-245, 2004.

HÄNNINEN, M.L.; HÖRMAN, A.; RIMHANEN-FINE, R.; VAHTERA, H.; MALMBERG, S.; HERVE, S.; LAHTI, K. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the Vantaa river basin, southern Finland. **Int. J. Hyg. Environ. Health** **208**: 163-171, 2005.

HASSEN A., MAHROUK, M., OUZARI, H., CHERIF, M., BOUDABOUS, A., DAMELIN COURT, J.J. UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. **Bioresour. Tech.** **74**: 141-150, 2000.

HAYES, S.L.; RICE, E.W.; WARE, M.W.; SCHAEFER III, F.W. Low pressure ultraviolet studies for inactivation of *Giardia muris* cysts. **J. Appl. Microbiol.** **94**: 54-59, 2003.

HIJNEM, W.A.M.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation (oo)cysts in water: a review. **Wat. Res.** **40**: 3-22, 2006.

HUNTER, P.R.; THOMPSON, R.C.A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int. J. Parasitol.** **35**: 1181-1190, 2005.

HSU, B.M.; YEH, H.H. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water treatment a pilot-scale study. **Wat. Res.** **35**: 1111-1117, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Atlas de Saneamento**, Rio de Janeiro, 2002.

JABUR, P.; MIORIN, L.A.; SILVA, H.G.C.; PASCHOALOTTI M.A.; CHIEFF, P.P.; SENS, Y.A.S. Criptosporidiose e outras enteroparasitoses em pacientes submetidos a transplante renal ou hemodiálise. **J. Bras. Nefrol.** **18 (3)**: 239-242, 1996.

JENKINS, M.C. Advances and propects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. **Vet. Parasitol.** **101**: 291-310, 2001.

JOACHIM, A.; ECKERT, E.; PETRY, F.; BIALEK, R.; DAUGSCHIES, A. Comparison of viability assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts after disinfection. **Vet. Parasitol.** **111**: 47-57, 2003.

JOHNSON A.M.; LINDEN, K.; CIOCIOLA, K.M.; LEON, R.D.; WIDMER, G.; ROCHELLE, P.A. UV inactivation of *Cryptosporidium hominis* as measured in cell culture. **Appl. Environ. Microbiol.** **71 (5)**: 2800-2802, 2005.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J. Water Health** **5 (1)**: 1-38, 2007.

KATO, S.; BOWMAN, D.D. Using flow cytometry to determine the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts extracted from spiked environmental samples in chambers. **Parasitol. Res.** **88**: 326-331, 2002.

KATZ, D.E.; HEISEY-GROVE, D.; BEACH, M.; DICKER, R.C.; MATYAS, B.T. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. **Epidemiol. Infect.** 1-7, 2006.

LABATIUK, C.W.; SCHAEFER III, F.W.; FINCH, G.R.; BELOSEVIC, M. Comparison of animal infectivity, excystation and, fluorogenic dye as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. **Appl. Environ. Microbiol.** **57 (11)**: 3187-3192, 1991.

LEAL, D.A.G.; PEREIRA, M.A.; BRANCO, N.; FRANCO, R.M.B. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in seawater bivalve mollusks in São Paulo coastal region, Brazil. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**. Submetido, 2007.

LEE, C.W.; BAE, S.D.; HAN, S.W.; KANG, L.S. Application of ultrafiltration hybrid membrane processes for reuse of secondary effluent. **Desalination** **202**: 239-246, 2007.

LEMARCHAND, K.; LEBARON, P. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. In a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. **FEMS Microbiol. Lett.** **218**: 203-209, 2003.

LINDEN, K.G.; SHIN, G.; SOBSEY, M.D. Comparative effectiveness of UV wavelengths for the inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. **Wat. Sci. Tech.** **43**: 171-174, 2001.

LUNA, E.J.A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e re-emergentes no Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.** **5**: 229-243, 2002.

MAC KENZIE, W.R.M.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVIS, J.P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **N. Engl. J. Med.** **331 (3)**: 161-167, 1994.

MACPHERSON, C.N.L. Human behavior and epidemiology of parasitic zoonoses. **Int. J. Parasitol.** **35**: 1319-1331, 2005.

MATURAMA, V.M.I.; ARES-MAZÁS, M.E.; DURAN-OREIRO, D.; LONRENZO-LORENZO, M.J. Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. **Appl. Environ. Microbiol.** **58 (11)**: 3514-3516, 1992.

McCUIN, R.M.; CLANCY, J.L. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. **J. Microbiol. Meth.** **63 (1)**: 73-88, 2005.

MEDEMA, G.J.; SCHETS, F.M.; TEUNIS, P.F.M.; HAVELAAR, A.H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.** **64 (11)**: 4460-4466, 1998.

MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Inf. Genet. Dis.** **3**: 233-244, 2003.

MONTEMAYOR, M.; VALERO, F.; JOFRE, J.; LUCENA, F. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in raw and treated sewage and river water in north-

eastern Spain. **J. Appl. Microbiol.** **99**: 1455-1462, 2005.

MORGAN-RAYN, U.M.; FALL, A.; WARD, L.A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: CRYPTOSPORIDIIDAE) from *Homo sapiens*. **J. Eukaryot. Microbiol.** **49**: 433-440, 2002.

MORITA, S.; NAMIKOSHI, A.; HIRATA, T.; OGUMA, K.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S.; MOTOYAMA, N.; FUJIWARA, M. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** **68** (11): 5387-5393, 2002.

MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; WADA, M.Y.; JONES, J.L.; TUBOI, S.H.; CARMO, E.H.; RAMALHO, W.M.; CAMARGO, N.J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R.M.T.; SILVA, A.J.; MOURA, I.; DUBEY, J.P.; GARRET, D.O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerg. Infect. Dis.** **12**: 326-329, 2006.

MUJERIEGO, R.; ASANO, T. The role of advanced treatment in wastewater reclamation and reuse. **Wat. Sci. Tech.** **40** (4-5): 1-9, 1999.

MÜLLER, N. von ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **Int. J. Parasitol.** **35**: 1339-1347, 2005.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; QUEIROZ, E.F.O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A and parasitoses in children living in Brasília. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **35**: 133-142, 2002.

NEUMANN, N.F.; GYUREK, L.L.; FINCH, G.R.; BELOSEVIC, M. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolate after *in vitro* excystation are infectious to neonatal mice. **Microbiol Lett** **183** (2): 331-336, 2000.

NICOLAU, A.; NICOLINA, D.; MOTA, M.; LIMA, N. Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. **Res. Microbiol.** **152**: 621-630, 2001.

NISHI, S.M.; GENNARI, S.M.; LISBOA, M.N.T.S.; SILVESTREIM, A.; CAPRONI, J.R. L.; UMEHARA, O. Parasitas intestinais em suínos confinados nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Arq. Inst. Biol. São Paulo** **67** (2): 199-203, 2000.

NITHIUTHAI, S.; ANANTAPHRUTI, M.T.; WAIKAGUL, J.; GAJADHAR, A. Waterborne zoonotic helminthiasis. **Vet. Parasitol.** **126**: 167-193, 2004.

NOORDEEN, F.; HORADAGODA, N.U.; FAIZAL, A.C.M.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; RAZAK, M.A.A.; ARULKANTHAN, A. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* isolated from asymptomatic adult goats to mice and goat kids. **Vet. Parasitol.** **103**: 217-225, 2002.

OLIVEIRA, S.M.A.C.; von SPERLING, M. Avaliação de 166 ETE em operação no país, compreendendo diversas tecnologias. Parte 1: Análise de desempenho. **Eng. San. Amb.10**: 347-357, 2005a.

OLIVEIRA, S.M.A.C.; von SPERLING, M. Avaliação de 166 ETE em operação no país, compreendendo diversas tecnologias. Parte 2: Influência de fatores de projeto e operação. **Eng. San. Amb.10**: 358-368, 2005b.

OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W. *Giardia* vaccination. **Parasitol. Today 16 (5)**: 213-217, 2000.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU) Ecossistemas e Saúde Humana – Avaliação Ecossistêmica do Milênio, 6pp, 2006.

OTTOSON, J.; NSEN, A.; JÖRLENIUS, B.; NORDER, H, STENSTRÖM. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. **Wat. Res. 40**: 1449-1457, 2006.

PAYMENT, P.; PLANTE, R.; CEJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. **Can. J. Microbiol. 47**: 188-193, 2001.

PASSOS, L.A.; ALVES, D.P. **Isoladores**. In: Manual para técnicos em bioterismo. DE LUCA; R.R. ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B.; NEVES, S.P.(eds) 2^a ed. São Paulo, p. 27-43, 1996.

PEDERSEN, C.; DANNER, S.; LAZZARIN, A.; GLAUSER, M.P.; WEBER, R.; KATIAMA, C.; BARTON, S.E.; LUNDGREN, J.D. Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. **Genitourin. Med. 72**: 128-131, 1996.

PENG, M.M.; XIAO, L. FREEMAN, A.R.; ARROWOOD, M.J.; ESCALANTE, A.A.; WELTMAN, A.C.; ONG, C.S.L.; MAC KENZIE, LAL, A.A.; BEARD, C.B. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerging Infec. Dis. 3 (4)**: 567-573, 1997.

PÉREZ-ARRIAGA, L.; MENDOZA-MAGAÑA, M.L.; CORTÉS-ZÁRALE, R.; CORONA-RIVERA, A.; BOBADELLA-MORALES, L.; TROYO-SANROMÁN, R.; RAMÍREZ-HERRERA, M.A. Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. **Acta Tropica 98**: 152-161, 2006.

PIVA, B.; BENCHIMOL, M. The median body of *Giardia lamblia*: an ultraestructural study. **Biology of the Cell 96**: 735-746, 2004.

QUINTERO-BETANCOURT, W.; GENNACCARO, A.L.; SCOTT, T.M.; ROSE, B. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. **Appl. Environ. Microbiol. 69 (9)**: 5380-5388, 2003.

PANTELOURIS, E.M. Absence of thymus in a mouse mutant. **Nature** **217**: 370-671, 1968.

RAMIREZ, N.E; WARD, L.A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbs Infec.** **6**: 773-785, 2004.

REBOUÇAS, AC. **Aspectos relevantes do problema da água.** In: Águas doces no Brasil – capital ecológico, uso e conservação. Rebouças AC, Braga B, Tundisi JG. 2ª ed. Editora Escrituras, São Paulo, 2002.

REDLINGER, T.; CORELA-BARUD, V.; GRAHAM, J.; GALINDO, A. AVITIA, R. E. CARDENAS, V. Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States – México border. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **66 (6)**: 794 – 798, 2002.

RIVERA, W.L.; YASON, J.A.D.L.; RIVERA, P.T. Serological detection of cryptosporidiosis among Filipino cancer patients. **Parasitol. Res.** **98**: 75-76, 2005.

ROBERTSON, L.J.; PATON, C.A.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, P.G.; JACKSON, M.H.; GILMOUR, R. A.; BLACK, S.E.; STEVENSON, D.A.; SMITH, H.V. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Wat. Res.** **34 (8)**: 2310-2322, 2000.

ROBERTSON, L.J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B.K. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. **Appl. Environ. Microbiol.** **72 (8)**: 5297-5303, 2006a.

ROBERTSON L.J., HERMANSEN, L. GJERDE, B.K., STRAND, E., ALVSVAG, J.O., LANGE LAND, N. Application of genotyping during extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter, 2004. **Appl. Environ. Microbiol.** **72 (3)**: 2212-2217, 2006b.

ROBERTSON, L.J.; FORGERG, T.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B.K. Molecular characterization of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. **J. Infect.** 1-10, 2007.

ROCHELLE, P.A.; MARSHALL, M.M.; MEAD, J.R.; JOHNSON, A.M.; KORICH, D.G.; ROSEN, J.S.; LEON, D.R. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. **Appl. Environ. Microbiol.** **68**: 3809-3817, 2002.

ROCHELLE, P.A.; FALLAR, D.; MARCHALL, M.M.; MONTELONE, B.A.; UPTON, S.J.; WOODS, K. Irreversible UV inactivation of *Cryptosporidium* spp. Dispite the presence of UV repair genes. **J. Euk. Microbiol.** **51 (5)**: 553-562, 2004.

ROCHELLE, P.A.; UPTON, S.J.; MONTELONE, B.A.; WOODS, K. The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light. **TRENDS in Parasitol.** **21 (2)**: 81-87, 2005.

ROCKWELL, R.L. *Giardia lamblia* e giardiasis with particular attention to the Sierra Nevada, 2003. Disponível em <http://www.yosemit.org/naturenotes/archive.htm>. Acesso em Janeiro de 2007.

ROSE, J.B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. **Ann. Rev. Public. Health** **18**: 135-161, 1997.

ROSE, J.B.; HUFFMAN, D.E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiol. Rev.** **26**: 113-123, 2002.

ROSSIT, A.R.B.; ALMEIDA, M.T.G.; NOGUEIRA, C.A.M.; OLIVEIRA, J.G.C.; BARBOSA, D.M.U.; MOSCARDINI, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P.; GABBAY, Y.B.; MARQUES, F.R.; CARDOSO, L.V.; CAVASINI, C.E.; MACHADO, R.L.D. Bacterial, yeast, parasitic and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State, Southeastern, Brazil. **Diag. Microbiol. Infec. Dis.** **57**: 59-66, 2007.

SAKAMOTO G.; SCHWARTZEL, D.; TOMOWICH, D. UV disinfection for reuse applications in North America. **Wat. Sci. Tech.** **43 (10)**: 173-178, 2001.

SANIN, D.F.; VESILIND, P.A.; MARTEL, C.J. Pathogen reduction capabilities of freeze/thaw sludge conditioning. **Wat. Res.** **28 (11)**: 2393-2398, 1994.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Vet. Parasitol.** **146**: 17-24, 2007.

SANTOS, L.U.; BONATTI, T.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Occurrence of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** **46 (6)**: 309-313, 2004.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative". **TRENDS in Parasitol.** **22 (5)**: 203-208, 2006.

SEVALHO, G. Uma abordagem histórica das representações sociais de saúde e doença. **Cad. Saúde Publ. Rio de Janeiro** **9**: 349-363, 1993.

SILVA, F.C.; BOARETTO, A.E.; BERTON, R.S.; ZOTELLI, H.B. PEXE, C.A.; BERNARDES, E.M. Efeito de lodo de esgoto na fertilidade de um argissolo - vermelho-amarelo cultivado com cana de açúcar. **Pesq. Agropec. Bras.** **36 (5)**: 831-840, 2001.

SILVA, S.; ROLANDO, R.F.R.; BELLO, A.R. Genotipagem de isolados clínicos de *Cryptosporidium* spp. da cidade do Rio de Janeiro. **1º Fórum de Discussão do**

Eixo São Paulo-Rio de Janeiro sobre a Epidemiologia Molecular de *Cryptosporidium*, Campinas/SP dezembro de 2006.

SMITH, H.V.; CAMPBELL, B.M.; PATON, C.A. E NICHOLS, R.A.B. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* oocysts in water concentrates determined by using 4',6'-diamidino-2-phenylindole and immunofluorescence microscopy. **Appl. Environ. Microbiol.** **68 (10)**: 5198-5201, 2002.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R.C.A. Tools for investigation the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **TRENDS in Parasitol.** **22**: 160-167, 2006a.

SMITH, A.; REACHER, M.; SMERDON, W.; ADAK, G.K.; NICHOLS, G.; CHALMERS, R.M. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992 – 2003. **Epidemiol. Infect.** 1-9, 2006b.

STOTT, R.; JENKINS, T.; SHABANA, M.; MAY, E. A survey of the microbial quality of wastewater in Ismailia, Egypt and the implications for wastewater reuse. **Wat. Sci. Tech.** **35 (11-12)**: 211-217, 1997.

STOTT, R.; MAY, E.; MATSUSHITA, E.; WARREN, A. Protozoan predation as mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewater in constructed wetlands. **Wat. Sci. Tech.** **44 (11-12)**: 191-198, 2001.

SLAPETA J. *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. **TRENDS in Parasitol.** **22 (10)**: 469-474, 2006.

SLAPETA J. Response to Xiao et al.: further debate on the description of *Cryptosporidium pestis*. **TRENDS in Parasitol.** **23 (2)**: 42-43, 2007.

SODRÉ, F.C.; FRANCO, R.M.B. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **RBAC** **33 (2)**: 97-107, 2001.

SOUZA, J.T.; van HAANDEL, A.; LIMA, E.P.C.; HENRIQUE, I.N. Utilização de wetland construído no pós-tratamento de esgotos domésticos pré-tratados em reator UASB. **Eng. Sanit. Amb.** **9 (4)**: 285-290, 2004.

SUWA, M.; SUZUKI, Y. Occurrence of *Cryptosporidium* in Japan and counter-measures in wastewater treatment plants. **Wat. Sci. Tech.** **43 (12)**: 183-186, 2001.

SUWA, M.; SUZUKI, Y. Control of *Cryptosporidium* with wastewater treatment to prevent its proliferation in the water cycle. **Wat. Sci. Tech.** **47 (9)**: 45-49, 2003.

SUMINO, H.; TAKAHASHI M.; YAMAGUCHI, T.; ABE, K.; ARAKI, N.; YAMAZAKI, S.; SHIMOZAKI, S.; NAGANO, A.; NISHIO, N. Feasibility study of a pilot-scale sewage treatment system combining an up-flow anaerobic sludge blanket

(UASB) and na aerated fixed bed (AFB) reactor at ambient temperature. **Bioresource Tech.** **98**: 177-182, 2007.

SUNNOTEL, O.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G.; XIAO, L.; MILLAR, B.C.; ROONEY, P.J.; SNELLING, W.J. *Cryptosporidium*. **Lett. Appl. Microbiol.** **43**: 7-16, 2006.

TAM, L.D.; TANG, T.W.; LAU, G.N.; SHARMA, K.R.; CHEN, G.H. A pilot study for wastewater reclamation and reuse with MBR/RO and MF/RO systems. **Desalination** **202**: 106-113, 2007.

TANKUKAR, M.; OHASHI, A.; HIRADA, H. Performance comparison of a pilot-scale UASB and DHA system and activated sludge process for the treatment of municipal wastewater. **Wat. Res.** **41 (12)**: 2697-2705, 2007.

TELLEZ, A.; WINIECKA-KRUSNELL, J.; PANIAGUA, M.; LINDER, E. Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis. **Scan J. Infect. Dis.** **35**: 322-325, 2003.

TESSIER, J.L.; DAVIES, G.A.L. Giardiasis. **Infect. Dis. Update** **35**: 8-11, 1999.

THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet. Parasitol** **126**: 15-35, 2004.

TRAUB, R.J.; MONIS, P.; ROBERTSON, I.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R.C.A. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. **Parasitology** **128**: 253-262, 2004.

TUCCI, C.E.M. **Água no meio urbano**. In: Águas doces no Brasil – capital ecológico, uso e conservação. REBOUÇAS A.C.; BRAGA B.; TUNDISI J.G. 2ª ed. Editora Escrituras, São Paulo, 2002.

TURKCAPAR, N.; KUTLAY, S.; NERGIZOGLU, G.; ATLI, T.; DUMAN, N. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. **Nephron** **90**: 344-346, 2002.

TYRREL, S.A, RIPPEY, S.R., WATIKINS, W.D. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents using chlorine and ozone. **Wat. Res.** **29 (11)**: 2483-2490, 1995.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbiol. Infec.** **4**: 1047-1058, 2002.

VAZOLLÉR, R.F.; GARCIA, M.A.R.; GARCIA JR, M. D. E CONCEIÇÃO NETO, J. Microbiologia de Lodos Ativados. São Paulo, CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1989, 23 pp.

von GUNTEN, U. Ozonization of drinking water: part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. **Wat. Res.** **37**: 1469-1487, 2003.

von SPERLING, M. **Lodos ativados** in: Princípio do Tratamento Biológico de águas Residuárias. Ed. Universidade Federal de Minas Gerais. Vol. 4, 416p, 1997.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clin. Microbiol. Rev.** **17** (1): 72-97, 2004.

XIAO, L.; ZHOU, L.; SANTIN, M.; YANG, W.; FAYER, R. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. **Parasitol. Res.** **100**: 701-706, 2007.

ZALENGA, D.S.; TROUT, J.M. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. **Vet. Parasitol.** **126**: 195-217, 2004.

ZIMMER, J.L.; SLAWSON, R.M.; HUCK, P.M. Inactivation and potential of *Cryptosporidium parvum* following low and medium pressure ultraviolet irradiation. **Wat. Res.** **37**: 3517-3523, 2003.

ZINI, R.M.; SANTOS, C.C.M.; ALMEIDA, J.A.Z.C.; PERESE, J.T.M.; MARQUES, C.C.A. Atuação do Laboratório de Saúde Pública na elucidação do surto de diarreia causado por *Cyclospora cayetanensis* no município de General Salgado, S.P. **Rev. IAL** **63**: 116-121, 2004.

ZHAO, Y.; LOU, Z.; GUO, Y.; XU, D.; Treatment of sewage using an aged-refuse-based bioreactor. **J. Environ. Manag.** **82**: 32-38, 2007.

www.abidic.gov.br. Acesso em Maio de 2007.

www.ana.gov.br. Acesso em Janeiro de 2007.

www.sabesp.com.br. Acesso em Janeiro de 2005.

www.tratamentodeagua.com.br. Acesso em Setembro de 2003.